

# **Veri- ja imusuonimerkkiaineiden rooli kielisyöpäpotilaiden ennusteessa – systemaattinen kirjallisuuskatsaus**

Merimaija Kasanen

Hammaslääketieteen ja lääketieteen kandidaatti

Opiskelijanumero: 014815993

Suu- ja leukasairauksien osasto

Helsinki 9.7.2020

Syventävien opintojen tutkielma

[merimaija.kasanen@helsinki.fi](mailto:merimaija.kasanen@helsinki.fi)

Ohjaaja: Tuula Salo. HLT, EHL

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Suu- ja leukasairauksien osasto	
Tekijä – Författare – Author Merimaija Kasanen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Veri- ja imusuonimerkkiaineiden rooli kielisyöpäpotilaiden ennusteessa – systemaattinen kirjallisuuskatsaus			
Oppiaine – Läroämne – Subject Suupatologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävien opintojen tutkielma	Aika – Datum – Month and year 9.7.2020	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 48+2	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Kielisyöpä (TSCC) on yksi yleisimmistä pään ja kaulan alueen syövästä, ja noin puolet siihen sairastuneista kuolee vuoden sisällä diagnoosin saamisesta. Imusolmukkeisiin leviäminen on kielisyövän kohdalla yksi tärkeimmistä ennusteeseen vaikuttavista tekijöistä ja se on kielisyövässä yleisin kuolemaan johtava syy. Koska kieli on elimenä pääasiassa lihasta ja siinä on luontaisesti runsaasti imusuonia, voi kasvaimen angiogeneesillä ja lymfangiogeneesillä olla merkittävä rooli syövän kehittämisessä ja leviämisessä. Kielisyöpäpotilaiden yksilöllisen ennusteen ja hoidon suunnittelun kannalta hyödyllisiä merkkiaineita ja luokittelumenetelmiä on kuitenkin vähän.</p> <p>Tutkimuksemme keskittyi systemaattisen kirjallisuuskatsauksen menetelmin selvittämään, voidaanko veri- ja imusuonimerkkiaineita hyödyntää kielisyöpäpotilaiden ennusteen arvioinnissa. Katsauksemme löysi kolmesta sähköisestä tietokannasta ja yhdestä ulkoisesta lähteestä yhteensä 516 tutkimusta, joista 13 valikoitui lopulliseen analysointiin.</p> <p>Veri- ja imusuonimerkkiaineista tutkimuksia löytyi CD31, CD34, CD105, FVIII, LYVE-1 sekä D2-40 -merkkiaineista. Lopullisista 13 artikkelista seitsemän raportoi jonkin näistä merkkiaineista olevan yhteydessä kielisyöpäpotilaiden alentuneeseen ennusteeseen. Lupaavimmat tulokset koskivat imusuonimerkkiainetta D2-40, josta hakumme tuotti 3 artikkelia. Kahdessa näistä tutkimuksista D2-40-positiivisten suonten korkean määrän raportoitui olevan yhteydessä alentuneeseen kokonaisselviytymiseen. Kolmannessa tutkimuksessa havaittiin D2-40- ja FVIII-positiivisten suonten välisen suhteen olevan yhteydessä alentuneeseen kokonaisselviytymiseen. Muita merkkiaineita koskevat tulokset olivat ristiriitaisia.</p> <p>Katsauksemme pieneen otokseen vedoten ja osittain lupaavista tuloksista huolimatta, ei mitään tutkituista veri- ja imusuonimerkkiaineista voida vielä suositella kliiniseen käyttöön. Aiheesta tarvitaan lisää tutkimuksia, ennen kuin voidaan tehdä luotettavia johtopäätöksiä merkkiaineiden ennusteellisesta roolista. (208 sanaa)</p> <p>Systemaattinen katsauksemme <i>"Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review"</i> julkaistiin viime vuonna kansainvälisessä julkaisusarjassa [Almahmoudi ym. Cancer Science 2019;110(11):3424-3433].</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Tongue neoplasms; survival analysis; angiogenesis; lymphangiogenesis			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Clinicum, Terkko. Sähköinen versio: Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## Sisällysluettelo

1 Johdanto.....	1
1.1 Kielisyövän kliiniset mittarit.....	1
1.2 Veri- ja imusuonten uudismuodostus.....	2
1.3 Syövän ennustetekijöiden rooli potilaan hoidossa .....	3
2 Tutkimuksen tavoitteet.....	3
3 Aineisto ja menetelmät .....	4
3.1 Tutkimuksen rekisteröinti.....	4
3.2 Tiedonhaku OvidMedlinesta, Scopuksesta sekä Cochrane Librarysta .....	4
3.3 Aiheeseen liittyvien hakutulosten valikointi .....	5
3.4 Katsaukseen tarvittavien tietojen koonti artikkeleista .....	6
3.5 Tietolähteiden laadun ja harhariskin arviointi .....	7
4. Tulokset .....	9
4.1 Systemaattisen haun tulokset.....	9
4.2 Harhariskiarvion tulokset .....	11
4.3 Potilasryhmien leikkausta edeltävä hoito.....	11
4.4 Verisuonten tiheys ennustetekijänä kielisyövässä.....	11
4.4.1 Verisuonimerkkiaine CD34.....	11
4.4.2 Verisuonimerkkiaineet CD31 ja CD105 .....	12
4.4.3 Verisuonimerkkiaine FVIII.....	12
4.5 Imusuonten tiheys ennustetekijänä kielisyövässä.....	13
4.5.1 Imusuonimerkkiaine D2-40.....	13
4.5.2 Imusuonimerkkiaine LYVE-1 .....	14
5 Pohdinta.....	14
6 Oma osuuteni itse julkaisussa .....	17
Lähdeluettelo .....	19
Liitteet .....	32
Liite 1. Itse julkaisu <i>“Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review”</i> .....	32
Liite 2. MASTARI-menetelmän tulokset ja kysymykset .....	47

# 1 Johdanto

Kielisyöpä (TSCC) on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä pään ja kaulan alueen syövistä ja sen ilmentyvyys Pohjoismaissa sekä suuressa osassa muita maita on jatkuvassa kasvussa <sup>1, 2</sup>. Runsas alkoholinkäyttö ja erityisesti siihen yhdistetty tupakointi altistavat suun alueen syöville <sup>3</sup>. Nämä tekijät eivät kuitenkaan voi selittää jatkuvaa kielisyöpätapausten määrän nousua, sillä sairastuneista nykyään yhä useampi on alkoholia vain vähän käyttävä ja tupakoimaton <sup>4</sup>. Tämän lisäksi kielisyöpäpotilaiden keskuudessa nuorten aikuisten osuus on kasvanut <sup>5</sup>.

Kielisyövällä on edelleen huono ennuste eikä se ole merkittävästi parantunut viimeisten vuosikymmenten aikana tutkimuksista huolimatta <sup>6, 7</sup>. Kielessä on luontaisesti rikas imusuonitus ja se on pääasiassa lihasta, mikä mahdollistaa kielisyövän helpon leviämisen kaulan alueen imusolmukkeisiin. Kielisyövän kohdalla metastasointi kaulan imusolmukkeisiin onkin tärkein ennusteeseen vaikuttava tekijä. <sup>8</sup>

## 1.1 Kielisyövän kliiniset mittarit

Kielisyövässä käytetään tällä hetkellä tärkeimpänä kliinisenä mittarina TMN-luokitusta siitä huolimatta, että kielisyövän uusista mahdollisista kliinisistä mittareista on tehty paljon tutkimusta <sup>9, 10</sup>. TMN-luokitusta käytetään laajasti myös monien muiden syöpien luokitteluun ja se ilmaisee syövän primaarikasvaimen koon, läheisten imusolmukkeiden osallisuuden sekä distaalisten metastaasien määrän. Luokittelu ei kuitenkaan ota huomioon syövän biologista käyttäytymistä ja syöpien yksilöllistä heterogeenisyyttä. Tutkimuksissa onkin havaittu, että TMN-luokittelun ennusteellinen arvo alkuvaiheen kielisyövässä on pientä tai täysin olematonta <sup>11, 12</sup>.

Kielisyövän luotettavaan diagnosointiin kaivataan TNM-luokittelua täydentämään syövän histologia ja syövässä ilmentyvät biologiset merkkiaineet huomioon ottavia uusia luokittelutapoja <sup>13, 14</sup>. Tyydyttävää luokittelutapaa ei kuitenkaan ole vielä

löydetty, ja tällä hetkellä kielisyöpä on edelleen vailla luotettavia ennustetekijöitä, joita voitaisiin hyödyntää potilaan ennusteen ja hoitovasteen arvioinnissa.

## 1.2 Veri- ja imusuonten uudismuodostus

Angiogeneesi sekä lymfangiogeneesi eli veri- ja imusuonten uudismuodostuminen ovat kasvainten kehityksen ja kasvainsolumäärän lisääntymisen kannalta elintärkeitä tekijöitä. Muiden kudosten tavoin myös syöpäkasvainten solut tarvitsevat elääkseen veren mukana saatuja ravinteita sekä happea. Tämän lisäksi verenkierto mahdollistaa solujen tuottamien tarpeettomien metaboliatuotteiden sekä hiilidioksidin poistamisen soluista ja soluvälitilasta. Verisuonten uudismuodostumisen aikaansaaminen onkin syöpäkasvainten soluille välttämätöntä ja ilmiö on luokiteltu yhdeksi kuudesta syövän kehittymisen pääperiaatteista (*"hallmarks"*).<sup>15</sup> Kuten myös kielisyövän kohdalla, veri- ja imusuonten uudismuodostumisen yhtenä tärkeimpänä tehtävänä on mahdollistaa syövän etäpesäkkeiden muodostuminen muihin kudoksiin<sup>16</sup>. Angiogeneesin ja lymfangiogeneesin mahdollistama syöpäkasvainten oma veri- ja imusuonitus avaa ravitsemisen lisäksi syöpäsoluille reitin systeemiseen veren- ja lymfakiertoon, jonka välityksellä ne voivat kulkeutua uusille kasvupaikoille<sup>15</sup>. Lähes kaikilla pahalaatuisilla syöpäkasvaimilla on kyky luoda etäpesäkkeitä läheisiin imusolmukkeisiinsa tai distaaliin kudoksiin<sup>17</sup>. On kuitenkin syöpäkohtaista, tapahtuuko metastasointi pääasiallisesti veri- vai imusuonia pitkin. Osa syöivistä hyödyntää metastasoinnissaan samanaikaisesti molempia reittejä, kun taas toiset syövät, kielisyöpä (TSCC) mukaan lukien, hyödyntävät tärkeimpänä metastasointireittinään imusuonistoa.<sup>16,18</sup>

Syöpäsolujen leviäminen imusuonistoon on mekanismina ihmisten syöissä edelleen epäselvää. Ei ole täysin varmaa, tapahtuuko syöpäkasvaimen solujen leviäminen imusuonistoon kasvaimen aikaansaaman lymfangiogeneesin kautta vai tunkeutuvatko syöpäsolut kasvaimen ulkopuoliseen jo olemassa olevaan imusuonistoon. Lymfangiogeneesin rooli syövän leviämisessä on usein jäänyt pienemmälle huomiolle, sillä imusuonille spesifejä merkkiaineita on ollut tiedossa

vähemmän kuin verisuonikohtaisia merkkiaineita.<sup>19</sup> Imusuonikohtaisten merkkiaineiden löytymisen johdosta syöpätutkimuksissa on voitu angiogeneesin ohella alkaa tarkemmin tutkia myös lymfangiogeneesin roolia.

Veri- ja imusuonia on aikaisemminkin hyödynnetty muuttujina useissa syöpätutkimuksissa, ja tutkimusaineistona on ollut mukana myös pään ja kaulan alueen syöpiä. Näissä tutkimuksissa on selvitetty kasvainbiologiaa, ennustetekijöitä sekä syövän hoidon kannalta tärkeitä kohteita.<sup>20, 21, 22, 23</sup> Veri- ja imusuonia tutkittaessa käytetään hyödyksi suonissa luontaisesti esiintyviä immunohistokemiallisia vasta-aineita, joita voidaan havaita värjäysmenetelmien avulla. Näitä vasta-aineita ovat esimerkiksi verisuonimerkkiaineet CD34, CD31, CD105 (endogliini) sekä FVIII. Imusuonille vastaavia merkkiaineita ovat esimerkiksi D2-40 (podoplaaniini) sekä LYVE-1.

### **1.3 Syövän ennustetekijöiden rooli potilaan hoidossa**

Potilaan ennusteellisten tekijöiden kartoittaminen syövän diagnosointihetkellä on välttämätöntä, jotta potilaan hoitoa voidaan suunnitella mahdollisimman tehokkaaksi<sup>24</sup>. Tietojemme mukaan kielisyöpään (TSCC) ei ole tällä hetkellä vielä yhtäkään merkkiainetta, jonka esiintyminen olisi luotettavasti yhteydessä potilaiden ennusteeseen ja hoitovasteeseen. Useat tutkimukset ovat kuitenkin pyrkineet selvittämään kasvaimen suonituksen ennusteellista roolia kielisyövän kehityksessä.

## **2 Tutkimuksen tavoitteet**

Tutkimuksemme tavoitteena oli systemaattisen kirjallisuuskatsauksen menetelmin selvittää, onko veri- ja imusuonimarkkereiden ilmentymisellä ja ilmentymisen voimakkuudella yhteyttä kielisyöpäpotilaiden selviytymiseen. Mikäli merkkiaineen ja selviytymisen välillä oleva yhteys olisi havaittavissa ja tutkimustietoa löytyisi reilusti, voitaisiin merkkiaineen käyttöä alkaa kehittää avuksi potilaiden ennusteen

arvioinnissa ja kliinisen hoidon suunnittelussa. Systemaattinen katsauksemme *"Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review"* ilmestyi Cancer Science -julkaisusarjassa marraskuussa 2019 <sup>25</sup> (Liite 1.).

Katsausartikkelimme pohjautuu Ovid Medline -, Scopus- sekä Cochrane libraries -tietokantoihin 28.7.2018 tekemämme artikkelahaun tuloksiin. Kokosimme yhteen kyseisistä tietokannoista kaikki löytyneet artikkelit, jotka käsittelivät veri- ja imusuonimarkkereita ja niiden ennusteellista merkitystä kielisyöpäpotilailla. Kokonaisuudessaan analysointiin saatiin 516 artikkelia, joista lopulliseen tutkimukseen valikoitui 13 tutkimusta.

## **3 Aineisto ja menetelmät**

### **3.1 Tutkimuksen rekisteröinti**

Katsaustutkimuksemme rekisteröitiin heti projektin alkaessa "International prospective register of systematic reviews" PROSPERO -tietokantaan numerolla CRD42019115141. Rekisteröinnin tarkoituksena oli välittää laajan tiedeyhteisön tietokantaan tieto käynnissä olevasta tutkimuksestamme, jotta samasta aiheesta ei tehtäisi päällekkäistä tutkimusta muualla.

### **3.2 Tiedonhaku OvidMedlinesta, Scopuksesta sekä Cochrane Librarysta**

Artikkelihakumme käsitti erikseen 3 sähköistä tietokantaa: Ovid Medline, Scopus sekä Cochrane Library. Systemaattinen haku toteutettiin 28. heinäkuuta 2018 ja hakutermeinä käytimme sanoja: ("tongue") AND ("cancer" OR "neoplasm" OR "carcinoma" OR "squamous cell carcinoma" OR "tumor\*") AND ("angiogenesis" OR "blood vessel" OR "lymphangiogenesis" OR "lymphatic vessel" OR "lymph vessel" OR

“cd31\*” OR “cd34\*” OR “cd45\*” OR “icam-1\*” OR “cd54\*” OR “lyve-1\*” OR “tie-2\*” OR “tek\*” OR “vcam-1\*” OR “cd106\*” OR “ve cadherin” OR “vegf-r2” OR “vascular endothelial growth factor receptor 2” OR “FVIII-RA” OR “FVIII” OR “factor 8” OR “von willebrand factor” OR “vwf” OR “erg” OR “vegf” OR “d2-40” OR “podoplanin” OR “prospero-related homeobox-1” OR “vegf-r3” OR “peripheral node addressin antibody”). Hakumme tunnisti hakutermiä kokonaisuudessaan sekä lyhennettyinä. OvidMedlinen advanced-haussa asetimme hakutermien halutuksi sijaintipaikaksi: ”abstract”, ”original title”, ”subject heading” tai ”keyword”.

### **3.3 Aiheeseen liittyvien hakutulosten valikointi**

Kun systemaattinen haku oli suoritettu kaikissa kolmessa eri tietokannassa, koottiin saadut artikkelit samaan RefWorks-kansioon läpikäymistä varten. Ensimmäiseksi tulosten läpikäynnissä poistettiin kahdesti esiintyvistä artikkeleista kopiot. Mikäli samoja potilastietoja käytettiin useammassa julkaisussa, julkaisuista viimeisin valittiin mukaan. Haku tehtiin ilman aika- ja kielirajoituksia, mutta haun suorittamisen jälkeen ilmestyneitä artikkeleita ei ole huomioitu. Hakutulosten läpikäynnissä kirjoittajat (R.A. sekä M.K.) kävivät itsenäisesti läpi kaikki artikkelit. Artikkeleiden karsiminen tehtiin alkuvaiheessa pääasiassa otsikkoon ja tiivistelmään perustuen ja jatkoanalysoinnissa valinta perustui julkaisujen koko tekstiin. Mukaan otettujen artikkeleiden varmistettiin täyttävän sisäänottokriteerit jatkoanalysointia varten.



**Taulukko 1. Artikkeleiden sisäänottoon ja hylkäämiseen johtavat kriteerit**

Sisäänottokriteerit ("inclusion criteria")	Poissulkukriteerit ("exclusion criteria")
<ul style="list-style-type: none"> <li>Kudosnäytteet ovat ihmisiltä</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Saatu julkaisu on tekstityypiltään               <ul style="list-style-type: none"> <li>Yksittäistapauksesta kirjoitettu julkaisu</li> <li>Katsausartikkeli</li> <li>Kirje</li> <li>Kirjan kappale</li> <li>Konferenssiivistelmä</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Tutkimus perustuu potilaisiin, joilla on diagnosoitu kielisyöpä (TSCC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Artikkeli on kirjoitettu jollain muulla kielellä kuin englannilla</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Artikkelissa on kuvattuna veri-/imusuonimerkkiaineiden esiintymisen roolia potilaan kliinisiin ominaisuuksiin ja/tai selviytymiseen liittyen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Artikkelin tuloksissa sekoitetaan kielen ja muiden suunalueen syöpien tietoja</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Artikkelin tulokset perustuvat eläinmalleihin tai -kokeisiin</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tutkimus on puutteellinen potilaiden kliinisten tietojen ja/tai selviytymiseen liittyvien tietojen suhteen</li> </ul>

### 3.4 Katsaukseen tarvittavien tietojen koonti artikkeleista

Lopullisista mukaan otetuista artikkeleista koottiin kaikista erikseen kyseiset tarkentavat tiedot: (a) artikkelin perustiedot: kirjoittaja, julkaisuvuosi, tutkimuksen ajanjakso ja potilaiden seuranta-aika; (b) potilaan ja kasvaimen tiedot: potilaiden maantieteellinen sijainti ja määrä, keski-ikä, sukupuoli, kasvaimen sijaintipaikka ja koko, sairauden aste, potilaiden määrä ja positiivisten värjäystulosten saaneiden

potilaiden määrä, vasta-aineen nimi, valmistaja ja laimennussuhde sekä näytteen säilömismenetelmä (parafiiniin valettu vai jäädytetty); (c) selviytymisanalyysi: selviytymisen tyyppi, päätepiste, Kaplan-Meier -kuvaajat sekä tilastolliset tulokset (arvioitu riskitiheyksien suhde [HR], 95% luottamusväli [CI] sekä p-arvot, joiden luokiteltiin olevan tilastollisesti merkityksellisiä, kun pätee  $p \leq 0,05$ ); (d) Merkkiaineiden ilmentymistä mittaavat muuttujat: imu- ja verisuonten tiheys, värjäytymisen sijainti sekä "cut-off -arvo", jolla määriteltiin positiivisen ilmentymisen raja.

### 3.5 Tietolähteiden laadun ja harhariskin arviointi

Varmistuaksemme katsaukseeimme valikoituneiden tutkimusten luotettavuudesta, arvosteltiin ne REMARK-suositukseen perustuen. Kahdestakymmenestä kysymyksestä koostuvan REMARK-tarkastuslistan tarkoituksena on varmistaa julkaisuissa esitettyjen tietojen laatu ja toistettavuus. Tarkastuslista on esitetty alla olevassa taulukossa (Taulukko 2.).

#### Taulukko 2. Artikkeleiden REMARK-tarkastuslista

(Mukautettu julkaisusta Almangush et al. <sup>14</sup>)

Tarkistuslista	Kriteerit
1-Potilasnäytteet	Kyseessä on retrospektiivinen tai prospektiivinen potilasryhmä, joka on hyvin määritelty ja siitä on ilmoitettu tutkittavien potilaiden määrä, näytteen lähde, tutkimusaika sekä seuranta-aika. Julkaisun kirjoittajat selostavat potilaiden saamat lääketieteelliset toimenpiteet ja selventävät, saivatko kaikki potilaat keskenään samaa hoitoa vai eivät.
2-Potilasjoukon kliiniset tiedot	Kliiniset perustiedot: sukupuoli, ikä, syövän kliininen aste ja histopatologinen luokka raportoitu.

Tarkistuslista	Kriteerit
3-Immunohistokemia	Hyvin selostetut värjäysmenetelmät tai viittaaminen ne sisältävään aikaisempaan julkaisuun löytyvät. Värjäyksestä mainittuna on primaarisen vasta-aineen nimi, laimennus sekä valmistaja. Cut off-arvo, jolla määritellään positiivinen ilmentyminen, on selkeästi kuvattu.
4-Ennusteet	Selviytymisen päätepisteet on määritelty (esimerkiksi kokonaisselviytyminen tai tautivapaa elossaoloaika).
5-Tilastotiedot	Arvioidut vaikutukset (riskitiheyssuhde HR, luottamusväli CI) kuvaavat tutkittujen merkkiaineiden roolia ja lopputulokset on selostettu. Asianmukaiset tilastolliset menetelmät (esimerkiksi Coxin regressiomalli) ovat esiteltynä ja niiden avulla on mukautettu arvio merkkiaineen vaikutuksesta tunnettuihin ennustetekijöihin.
6-Klassiset ennustetekijät	Klassisten ennustetekijöiden ennusteellinen arvo sekä tutkittujen merkkiaineiden ja klassisten ennustetekijöiden välinen suhde on selostettu.

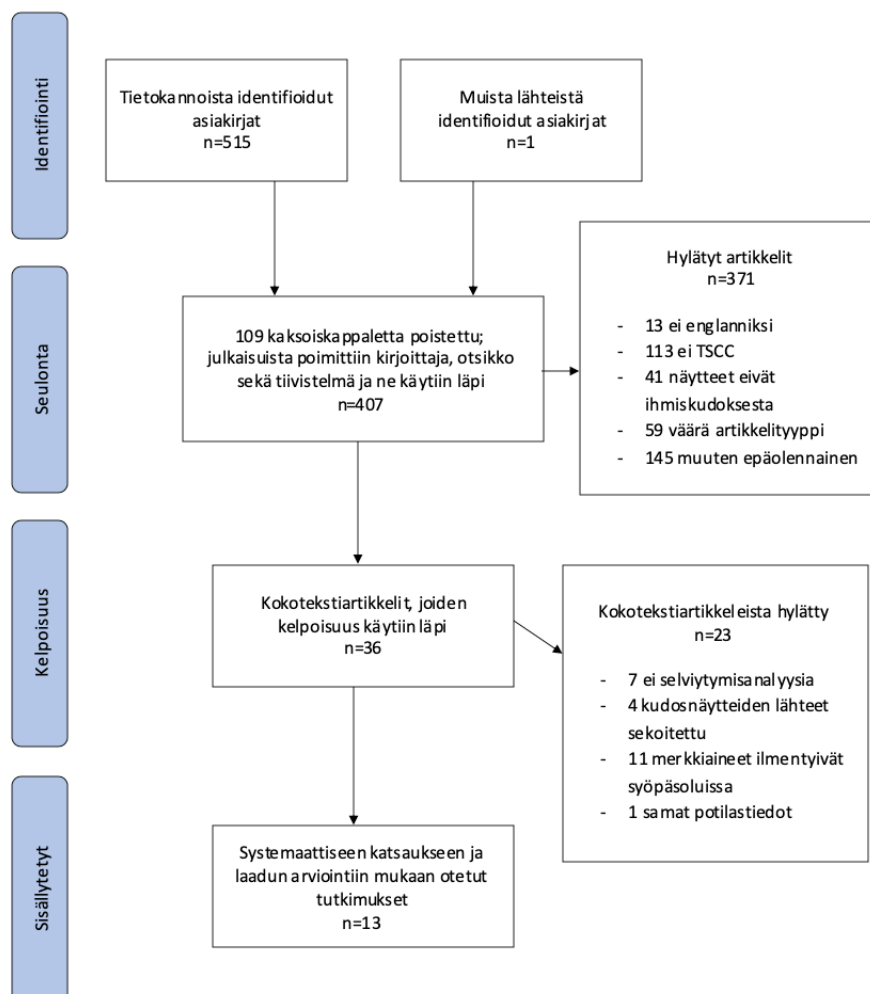
Tämän lisäksi kirjoittajat (R.A. ja M.K.) vastasivat kymmeneen MASTARI-kysymykseen jokaisen katsaukseen valikoituneen artikkelin kohdalla tiedon harhariskin ("risk of bias") arvioimiseksi. Vastausvaihtoehdot kysymyksiin vastatessa olivat kyllä "Y", ei "N", epäselvä "U" sekä ei sovellettavissa "NA". Harhan riski määriteltiin korkeaksi, kun julkaisun tulokset saavuttivat korkeintaan 49 prosenttisesti vastauksen "kyllä". Kohtalaiseksi se määriteltiin, kun vastauksista "kyllä" oli 50%-69% ja matalaksi, kun "kyllä"-vastauksia oli kaikista vastaksista 70% tai enemmän.

## 4. Tulokset

### 4.1 Systemaattisen haun tulokset

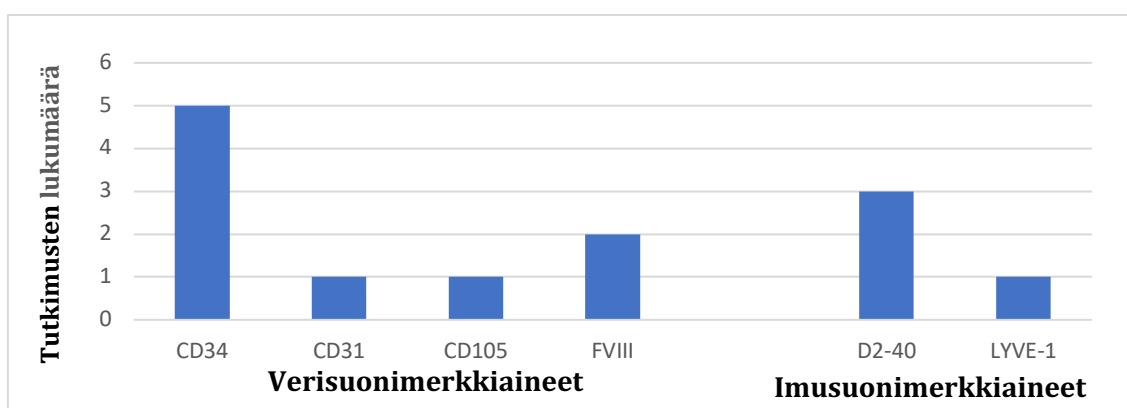
Hakumme tuotti yhteensä 515 artikkelia (332 OvidMedlinesta, 142 Scopuksesta ja 41 Cochrane Librarysta) ja muutamaa viikkoa aikaisemmin OvidMedlinessa tehdystä suppeammasta hausta mukaan otettiin yksi artikkeli. Otsikoiden ja tiivistelmien läpikäynnin jälkeen 36 artikkelia otettiin tarkempaan tarkasteluun. Näistä artikkeleista 13 täytti sisäänottokriteerit ja sisällytettiin katsaukseen. Artikkeleiden valikoituminen ja hylkäämiseen johtaneet syyt on esitetty PRISMA-kuvaajassa (Kaavio 1.).

**Kaavio 1. Julkaisujen valikoituminen PRISMA-kaaviona ("Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses")**



Systemaattiseen katsaukseen valikoiduissa artikkeleissa oli tutkittu suonimerkkiaineiden CD34, CD31, CD105, FVIII, D2-40 sekä LYVE-1 roolia kielisyöpäpotilaiden kliinisessä taudinkuvassa ja selviytymisessä. Verisuonten tiheyden mittaamiseen soveltuvista verisuonimerkkiaineista CD34, CD31, CD105 ja FVIII raporttoitiin katsauksemme artikkeleista yhteensä yhdeksässä. Verisuonimerkkiaine CD34 esiintyi viidessä artikkelissa <sup>26, 27, 28, 29, 30</sup>. CD31- ja CD105-merkkiaineita tutkittiin kumpaakin yhdessä artikkelissa <sup>31, 32</sup>. Ja merkkiainetta FVIII kahdessa artikkelissa <sup>33, 34</sup>. Imusuonimerkkiaine D2-40 esiintyi kolmessa katsauksemme julkaisussa <sup>35, 36, 37</sup>. LYVE-1 -merkkiaine esiintyi kahdessa julkaisussa <sup>28, 38</sup>. Merkkiainekohtaiset artikkelilukumäärät on havainnollistettu alla olevassa kaaviossa (Kaavio 2.).

**Kaavio 2. Veri- ja imusuonimerkkiaineiden esiintyminen 13 tutkimuksessa**



Selviytymisanalyysin päätepeisteistä kokonaisselviytymistä ("overall survival", OS) oli analysoitu neljässä artikkelissa <sup>26, 29, 36, 38</sup>. Tämän lisäksi selviytymisen päätepeisteinä oli tutkittu myös etenemisvapaata elossaoloaikaa ("progression-free survival", PFS)<sup>27</sup>, tautivapaata elossaoloaikaa ("disease-free survival", DFS) <sup>28, 32, 35</sup>, tautikohtaista elossaoloaikaa ("disease-specific survival", DSS) <sup>31, 34, 37</sup>, uusiutumisen vapaata elossaoloaikaa ("relapse-free survival", RFS) <sup>33</sup> sekä kasvainkohtaista selviytymistä ("tumor-specific survival") <sup>30</sup>.

## 4.2 Harhariskiarvion tulokset

Harhariskiarvio toteutettiin MASTARI-arviointimenetelmällä ja katsauksessa mukana olleet 13 artikkelia saivat tuloksekseen joko matalan (n=9) tai kohtalaisen (n=4) arvion. Artikkelikohtaiset tulokset ja menetelmän kysymykset on esitetty erillisessä taulukossa (Liite 2.).

## 4.3 Potilasryhmien leikkausta edeltävä hoito

Leikkausta edeltävän eli preoperatiivisen pitkäaikaisen sädehoidon on havaittu laskevan potilaiden verisuonten tiheyttä esimerkiksi peräsuolen syövässä <sup>39</sup>. Preoperatiivisella hoidolla saattaa olla vaikutusta myös kielisyöpäpotilaiden veri- ja imusuonten tiheyteen, joten kokosimme yhteen katsauksemme kolmestatoista tutkimuksesta preoperatiiviseen hoitoon liittyvät tiedot. Tutkimuksista seitsemässä potilaat eivät olleet saaneet mitään preoperatiivista hoitoa <sup>26, 27, 28, 29, 32, 36, 38</sup>, kun taas viidessä tutkimuksessa tieto puuttui kokonaan tai sitä ei ollut selkeästi ilmoitettu <sup>30, 31, 34, 35, 37</sup>. Yhdessä tutkimuksessa potilaat olivat saaneet ensihoitona leikkauksen tai sädehoitoa ja osa leikkauksessa olleista potilaista sai tämän lisäksi tehostavaa sädehoitoa, kemoterapiaa tai molempia edellä mainituista <sup>33</sup>.

## 4.4 Verisuonten tiheys ennustetekijänä kielisyövässä

### 4.4.1 Verisuonimerkkiaine CD34

Katsauksemme merkkiaineista CD34 tuotti eniten aiheeseemme sopivia julkaisuja, ja niitä oli kokonaisuudessaan viisi. Sasahira tutkimusryhmineen raportoi japanilaisessa 101 kielisyöpäpotilaan tutkimuksessaan korkean CD34-ilmentymisen olleen yhteydessä huonontuneeseen ennusteeseen ja alentuneeseen tautispesifiseen elossaoloaikaan ( $p=0,0249$ ) <sup>28</sup>. Samankaltaisia havaintoja tehtiin myös vuonna 2008 julkaistussa 59 potilaan kielisyöpätutkimuksessa. Tutkimuksessa Shao tutkimusryhmänsä kanssa raportoi kokonaiskuolleisuuden olleen merkittävästi alentunut potilailla, joilla CD34-merkkiaineen ilmentyminen oli korkeaa verrattuna potilaisiin, joilla ilmentyminen oli matalaa tai kohtalaista

( $p=0,020$ ).<sup>29</sup> Näiden lisäksi eräässä vanhemmassa tutkimuksessa Forootan tutkimusryhmineen havaitsi matalan verisuonitiheyden olleen yhteydessä parempaan ennusteeseen kielisyöpäpotilailla ( $p=0,023$ )<sup>30</sup>. Toisin kuin nämä kolme tutkimusta, Huang sekä Toyoda tutkimusryhmineen eivät raportoineet yhtä lupaavia tuloksia. Huang ei havainnut tilastollisesti merkittävää yhteyttä CD34-merkkiaineella havaitun verisuonitiheyden ja kokonaiselossaoloajan välillä 80 kielisyöpäpotilaan otoksessaan.<sup>26</sup> Myöskään Toyodan 85 potilaan tutkimus ei havainnut yhteyttä CD34-ilmentymisen ja kokonaiselossaoloajan tai etenemisvapaan elossaoloajan (PFS) välillä<sup>27</sup>.

#### **4.4.2 Verisuonimerkkiaineet CD31 ja CD105**

Katsauksemme artikkeleista yksi tutki verisuonimerkkiaineen CD31 yhteyttä potilaiden selviytymiseen. Tässä Fernandezin tutkimusryhmän toteuttamassa tutkimuksessa tulokset perustuvat melko pieneen, vain 43 kielisyöpäpotilaan ryhmään, ja Coxin regressioanalyysin perusteella kasvaimen verisuonituksen ei todettu olevan kielisyövässä ennustetekijänä ( $p=0,59$ ).<sup>31</sup> Myös verisuonimerkkiaine CD105 esiintyi yhdessä katsauksemme artikkelissa. Chuangin ja hänen tutkimusryhmänsä toteuttama taiwanilainen tutkimus käsitti 94 kielisyöpäpotilasta, ja Coxin regressioanalyysin perusteella CD105-verisuonimerkkiaineen ilmentyminen oli itsenäinen tekijä potilaiden selviytymisessä (suhteellinen riski 8,0; 95% CI, 2,525-25,839;  $p<0,001$ ). Tutkimuksessa kumulatiivisen 5 vuoden tautivapaan elossaoloajan lukumäärät olivat huomattavasti korkeampia potilailla, joiden CD105-merkkiaineen ilmentymisaste oli alhainen verrattuna niihin, joilla ilmentyminen oli korkea ( $p<0,001$ ).<sup>32</sup>

#### **4.4.3 Verisuonimerkkiaine FVIII**

Verisuonimerkkiaine FVIII esiintyi katsauksemme kahdessa tutkimuksessa. Intialaisessa tutkimuksessa Vora tutkimusryhmineen laski potilaan kielisyöpäkasvaimen verisuonten määrän keskiarvona kolmen eniten

verisuonitetun alueen suonten lukumääristä. Verisuonten määrä sai potilaiden leikkeissä arvoja välillä 0,0-10,33 ja mediaani asettui arvoon 0,0. Näitä arvoja tarkastelemalla havaittiin 84 potilaan ryhmässä, että mikäli levinneisyyden suhteen aikaisessa vaiheessa (vaiheet I ja II) olevan kielisyöpäpotilaan kasvaimen keskimääräinen verisuonten määrä oli yli mediaaniarvon 0,0, oli se huomattavasti yhteydessä alentuneeseen kokonaisselviytymiseen sekä uusiutumiseen vapaaseen elossaoloaikaan. Vastaavat p-arvot näille havainnoille olivat  $p=0,014$  ja  $p=0,032$ .<sup>33</sup> Suomalainen Kantola tutkimusryhmineen ei kuitenkaan havainnut FVIII-merkkiaineen ja kielisyöpäpotilaiden selviytymisen välillä yhteyttä 105 potilaan aineistossaan<sup>34</sup>.

## **4.5 Imusuonten tiheys ennustetekijänä kielisyövässä**

### **4.5.1 Imusuonimerkkiaine D2-40**

Katsauksemme lupaavimmat tulokset koskivat imusuonimerkkiainetta D2-40. Japanilaisessa Al-Shareefin ja hänen tutkimusryhmänsä 80 kielisyöpäpotilaan tutkimuksessa havaittiin merkittävä yhteys D2-40 -merkkiaineen ja imusolmukemetastaasien välillä. Myös kokonaisselviytyminen sekä tautivapaa elossaoloaika olivat alhaisempia potilailla, joilla kasvaimen imusuonitiheys oli korkeampi. Päätepisteiden raportoitiin olevan yhteydessä kasvaimen sisäiseen sekä ympäröivän kudoksen imusuonitiheyteen.<sup>35</sup> Samankaltaisista tuloksista raportoi myös Yan tutkimusryhmineen. Tutkimuksessaan he osoittivat huomattavan kokonaisselviytymisen laskun perustuen korkeaan D2-40-merkkiaineen esiintymiseen ( $p<0,001$ ). Merkkiaineen esiintymisen todistettiin 80 potilaan ryhmässä olleen myös yhteydessä kohonneeseen imusolmukeiden etäpesäkerisktiin.

<sup>36</sup> Kolmas tutkimus oli tehty Suomessa ja siinä Seppälä tutkimusryhmänsä kanssa ei raportoinut potilaiden selviytymisen ja imusuonten tiheyden välillä olevan yhteyttä. Tulosten käsittelyssä laskettu korkea imusuonten suhteellinen tiheys ("relative density of lymphatic vessels", RDLV) oli kuitenkin merkittävästi yhteydessä kielisyöpäpotilaiden alentuneeseen selviytymiseen ( $p=0,004$ ). Tutkimuksessa esiintynyt imusuonten suhteellinen tiheys laskettiin jakamalla D2-40 -



merkkiaineelle positiivisten imusuonten lukumäärä von Willebrandin tekijän suhteen positiivisten imusuonten lukumäärällä mikroskooppista aluetta kohti.<sup>37</sup>

#### 4.5.2 Imusuonimerkkiaine LYVE-1

Imusuonissa ilmentyvän merkkiaineen LYVE-1:n roolia kielisyöpäpotilaiden selviytymisessä tutkittiin kahdessa katsauksemme artikkelissa. Sasahira tutkimusryhmineen havaitsi, että LYVE-1 -merkkiaineelle positiivinen imusuonitiheys vaikutti negatiivisesti kielisyöpäpotilaiden tautivapaaseen elossaoloaikaan 101 potilaan otoksella. Tämän lisäksi havaittiin, että korkea imusuonitiheys oli yhteydessä myös heikompaan ennusteeseen kielisyöpäpotilailla ( $p < 0,0001$ ).<sup>28</sup> Sasahiran julkaisusta 4 vuotta myöhemmin julkaistu Dingin ja hänen tutkimusryhmänsä toteuttama tutkimus 50 kielisyöpäpotilaasta ei kuitenkaan osoittanut merkittävää yhteyttä LYVE-1 -merkkiaineen ja kokonaisselviymisen välillä.<sup>38</sup>

## 5 Pohdinta

Katsauksemme koosti yhteen 13 kliiniseen tutkimukseen perustuvaa julkaisua, joissa tutkittiin kokonaisuudessaan kuutta eri veri- ja imusuonimerkkiainetta. Yhteensä näissä tutkimuksissa oli mukana 973 kielisyöpäpotilasta. Kolmestatoista tutkimuksesta vain seitsemän julkaisua (53%) raportoi vähintään yhden tutkitun veri- tai imusuonimerkkiaineen olevan yhteydessä kielisyöpäpotilaiden selviytymiseen. Lähes kaikkien merkkiaineiden kohdalla tutkimustulokset olivat keskenään ristiriitaisia. Tämä varmasti osittain johtuu tutkimuksen vähäisestä määrästä sekä pienistä potilasotoksista. Tästä huolimatta imusuonimerkkiaine D2-40 osoitti lupaavimpia tuloksia.

Tarkastelemiamme veri- ja imusuonimerkkiaineita on tutkittu myös muiden syöpien kohdalla. Niiden roolia potilaiden selviytymisessä on raportoitu useissa

tutkimuksissa, joista monissa tulokset ovat olleet lupaavia. Kuten katsauksemme kuitenkin osoitti, on tutkimusten määrä silti kielisyövän kohdalla vähäinen.

Verisyöpämerkkiainetta CD34 on kielisyövän ohella tutkittu myös esimerkiksi pahalaatuisissa maksakasvaimissa, joissa sen on havaittu toimivan spesifisenä sekä sensitiivisenä merkkiaineena, jolla on ennusteellista arvoa <sup>40, 41</sup>. Lisäksi merkkiaineen CD34 voimakkaan ilmentymisen on raportoitu olevan yhteydessä alentuneeseen kokonaisselviytymiseen ei-pienisoluisessa keuhkosityövissä monimuuttuja-analyysiin perustuen ( $p=0,007$ ) <sup>42</sup>. Merkkiaineen CD34 on havaittu myös antavan angiogeneesiä mittaavissa värjäyksissä parempia tuloksia heikommalla taustavärjäytymisellä, mikä helpottaa verisuonten lukumäärän määrittämistä <sup>30</sup>.

Myös katsauksessamme kartoitettuja verisuonimerkkiaineita CD31, CD105, FVIII sekä Von Willebrand -tekijää on tutkittu useiden muidenkin syöpien kohdalla. Ei-pienisoluisessa keuhkosityövässä angiogeneesin suhteen parhaana merkkiaineena toimi CD105 ja sen raportoitiin olevan merkittävä ennustetekijä pienisoluisesta keuhkosityövästä selviytymisessä <sup>43</sup>. Tämän lisäksi syöpäkasvainten metastasoinnin ja CD105-merkkiaineen ilmentymisen välillä on havaittu useissa tutkimuksissa selkeä positiivinen yhteys. Vastaavanlaisia tuloksia on saatu muiden syöpien ohella myös pään ja kaulan alueen syövässä. <sup>44, 45</sup> Runsaan CD105-esiintyvyyden on raportoitu olevan yhteydessä myös suun alueen syöpien korkeaan levinneisyyteen <sup>46</sup>.

Merkkiainetta D2-40 (podoplaaniini) käytetään imusuonten havaitsemiseen ja sitä on käytetty monissa syövässä imusuonten invaasiota tutkittaessa <sup>47</sup>. Merkkiaineella on tärkeä rooli angiogeneesin ja lymfangiogeneesin tutkimisessa, sillä sen avulla voidaan selkeästi erottaa imusuonet verisuonista <sup>48</sup>. Merkkiainetta on hyödynnetty imusuoni-invaasion, metastaasien sekä potilaiden selviytymisen arviointiin esimerkiksi melanooma- ja rintasyöpätutkimuksissa. Niissä tulokset ovat viitanneet korkean D2-40 -merkkiaineella havaitun imusuonitiheyden olevan yhteydessä suurempaan etäpesäkkeiden muodostumisen riskiin sekä alentuneeseen selviytymiseen. <sup>47, 49, 50</sup> Suun alueen syöpien kohdalla D2-40-merkkiaineen

ilmentymistä on havaittu maligneissa sekä karsinoma in situ -leesioissa <sup>51</sup>. Sen lisäksi suusyöpävaaraa lisäävän leukoplakian riskin kehittyä maligniksi on raportoitu olevan positiivisesti yhteydessä korkean D2-40 -ilmentymisen kanssa <sup>52</sup>.

LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) on toinen imusuonille selektiivinen merkkiaine, jota voidaan hyödyntää imusuonten havaitsemisessa <sup>53</sup>. Pään ja kaulan alueen syövissä LYVE-1 -merkkiaineella havaitun kasvaimen sisäisen imusuonitiheyden sekä potilaiden imusolmuke-etäpesäkkeiden välillä on havaittu merkittävä positiivinen yhteys <sup>54</sup>. Tämän lisäksi LYVE-1 -positiivisten kasvaimen ulkopuolisten imusuonien sisällä on havaittu syöpäsolukertymiä pään ja kaulan alueen syövissä. Samassa tutkimuksessa raportoitiin myös kasvaimen sisäisen korkean imusuonitiheyden olevan yhteydessä korkeampaan imusolmukemetastaasien riskiin suunielun syövässä. <sup>55</sup> Pään ja kaulan alueen syövän tutkimuksissa on toisaalta myös havaittu korkean syöpäkasvaimen sisäisen LYVE-1 -ilmentymisen olevan yhteydessä kohonneeseen paikalliseen uusiutumisriskiin sekä heikentyneeseen tautikohtaiseen selviytymiseen <sup>56</sup>.

Vaikka useampi katsauksemme 13 artikkelista raportoi korkean merkkiaineilmentymisen olevan yhteydessä potilaiden alentuneeseen selviytymiseen, tutkimustietoa ei kuitenkaan ole vielä tarpeeksi, jotta luotettavia johtopäätöksiä näiden yksittäisten veri- ja imusuonimerkkiaineiden kohdalla voitaisiin tehdä. Katsauksemme tutkimuksien vähäinen määrä on selkeä osoitus siitä, että aiheesta tarvitaan vielä lisää suuremmilla potilasotoksilla tehtyjä tutkimuksia. Tämän lisäksi katsauksessamme mukana olleiden tutkimusten epäyhtenäiset veri- ja imusuonitiheyksien määrittelymenetelmät, osan tutkimuksien tilastollisten tietojen, kuten luottamusvälien ja riskitiheyssuhteiden puuttuminen, sekä kielen kasvainten tarkan sijaintipaikan vaihtelu vaikuttavat negatiivisesti koosteiden johtopäätösten luotettavuuteen. Katsauksesta saadut havainnot korostavat entisestään sitä, että kielisyövän kohdalla potilaiden ennusteen parantamiseksi tarvitaan yhä luotettavia solutason merkkiaineita, eikä niistä ole tehty vielä laajasti tutkimusta.

## 6 Oma osuuteni itse julkaisussa

Ennen varsinaisen artikkeliprojektin aloittamista työskentelin kesän 2018 Tuula Salon tutkimusryhmässä laboratorioavustajana. Seurasin ja avustin Ahmed Al Samadia kudoksen värjäämisessä sekä myöhemmin myös Rabeia Almahmoudia soluviljelyssä ja western blot –menetelmään perustuvissa proteiinitutkimuksissa.

Aloitin kirjallisuuskatsausprojektin Rabeia Almahmoudin kanssa yhteistyönä kesäkuun lopulla 2018 työskennellessäni edelleen Salon tutkimusryhmässä. Saadaksemme avustusta tieteellisen artikkelihaun tekemiseen olin heti aluksi yhteydessä Terkon informaatikkoon Katri Larmoon, joka lupasi olla avuksi. Sovin itselleni ja Almahmoudille tapaamisen Larmon kanssa, ja hän avusti meitä tekemään artikkelihaun valitsemisamme kolmessa tietokannassa OvidMedlinessä, Scopuksessa sekä Cochrane Libraryssa.

Saatuamme systemaattisen artikkelihaun ajettua tietokannoissa loin RefWorks-kansion, johon siirsin kaikki hausta saamamme artikkelit. Ensin kävin yksin läpi saamamme 516 artikkelien otsikot ja poistin joukosta monistuneiden artikkelien ylimääräiset kappaleet. Tämän jälkeen aloimme Almahmoudin kanssa käymään itsenäisesti läpi jäljelle jääneitä artikkeleita. Minimoidaksemme vääristymisriskin kävimme molemmat kaikki artikkelit ensin itsenäisesti läpi ja sen jälkeen vertailimme saamiamme tuloksia keskenään. Käydessämme artikkeleita läpi jaoimme artikkelit otsikon ja epäselvemmissä tilanteissa myös tiivistelmän perusteella mukaan otettuihin ja hylättyihin. Itse kirjasin ylös vielä jokaisen hylätyn artikkelin kohdalla hylkäämiseen johtaneen syyn. Näitä artikkelikohtaisia hylkäämissyitä käytin myöhemmin hyödykseni laatiessani PRISMA-kaaviota.

Eroteltuamme aiheitamme koskevat artikkelit kaikista hakutuloksista kokoustimme yhdessä ja keskustelimme muutamista eroavaisuuksista listoissamme. Pääsimme nopeasti yhteisymmärrykseen siitä, mitkä artikkelit olivat tutkimuksemme kannalta oleellisia ja siirryimme artikkelien tarkempaan läpikäyntiin. Luimme tämän jälkeen edelleen itsenäisesti jäljelle jääneet artikkelit

hyläten yhä joukosta artikkelit, jotka eivät vastanneet tutkimuksemme kysymykseen. Lopullisista 13 artikkelista keräsimme osiossa 3.4 kuvatut tiedot ja vertailimme edelleen niistä koostamiamme tuloksia keskenään.

Koottuamme lopullisten artikkeleiden tiedot ylös, laadin katsauksemme PRISMA-kaavion (Kaavio 1.), joka kuvastaa artikkeleiden valikoitumista katsauksen edetessä sekä artikkeleiden hylkäämiseen johtaneita syitä. Artikkeleiden tulkinnasta aiheutuvaa harhariskiä arvioidaksemme suoritimme molemmat itsenäisesti artikkeleiden "Risk of bias" -analyysin perustuen MASTARI-menetelmään. Harhariskianalyysissä laskimme artikkeleiden luotettavuusasteen, joka perustui esimerkiksi artikkelin tutkimus- ja analysointimetodeihin sekä tulosten raportoinnin selkeyteen. Lopuksi kokosin analyysimme tulokset taulukoksi ja laskin riskien numeeriset arvot, joilla määriteltiin, onko artikkelikohtainen harhariski matala, keskitasoinen vai korkea. Taulukko sisällytettiin osaksi katsauksemme liitteitä.

Kirjoitustyön jaoimme Almahmoudin kanssa osiin. Almahmoudi oli julkaisumme pääasiallinen kirjoittaja. Itse kirjoitin "Materials and methods" -osion, joka koostui tiedonhaun menetelmistä sekä tiedonkeruusta. Tämän lisäksi laadin julkaisun PRISMA-kuvaajan, harhariskianalyysin "risk of bias" -taulukon sekä alkuperäiset versiot katsauksen merkkiaineikohtaisista koostetaulukoista.

Koko tutkimusprosessin ajan kiinnitimme Almahmoudin kanssa erityistä huomiota siihen, että tutkimuksemme tulokset eivät olleet riippuvaisia yhden henkilön henkilökohtaisista päätöksistä. Jaoimme jatkuvasti mielipiteitä epäselvissä tilanteissa ja varmistimme, että päätökset tehtiin yhteisymmärryksessä. Koko kirjoittamisprosessin ajan olimme tiiviisti yhteydessä ja annoimme palautetta ja lisäyksiä toistemme kirjoittamiin teksteihin.

Julkaisuprojektimme oli koko prosessin ajan rekisteröitynä NIHR:n "International prospective register of systematic reviews" -sivulle (PROSPERO). Heti alkuvaiheessa tein tunnukset Prospero-sivuille ja rekisteröin systemaattisen kirjallisuuskatsausprojektimme tietokantaan. Rekisteröintiä varten kokosin sivulle

projektin tiedot, kuten aiheen, tavoitteet, etenemissuunnitelman, aikataulun sekä julkaisun tekemisessä mukana olevien henkilöiden nimet. Katsausprojektin edetessä olin myös vastuussa julkaisumme Prospero-sivun päivittämisestä. Ilmoitin ylläpitäjille julkaisumme aikataulusta ja syksyllä 2019 välitin heille lopulliset tiedot katsauksemme julkaisemisesta "Cancer Science" -lehdessä.

Syventävien opintojen projekti opetti minulle erityisesti tieteellisten tutkimusten lukutaitoa sekä kirjoitustyyliä. Koska aloitin tutkimusprojektini heti ensimmäisen opiskeluvuoden jälkeen, olivat nämä asiat minulle ennen projektin alkua hyvinkin vieraita. Projektin edetessä opin paljon tieteellisestä kirjoittamisesta ja kirjallisuuskatsauksen toteuttamisesta, joita palkitsevasti pääsinkin toteuttamaan alan lehdessä julkaistavan artikkelin muodossa. Näiden lisäksi oli opettavaista ja palkitsevaa saada olla osana tutkimusryhmää, joka auttoi ja oli jatkuvasti tukenani ihan katsauksen suunnittelusta julkaisemiseen ja jälkipuintiin asti. Ennen kaikkea tämä kahden vuoden projekti opetti minulle pitkäjänteisyyttä ja sinnikkyyttä oppia täysin uusia ja aluksi vaikealta tuntuvia asioita, jotka lopulta kartuttivat omaa osaamistani ja kyvykkyyden tunnetta.

## Lähdeluettelo

1. Annertz K, Anderson H, Palmer K, Wennerberg J. The increase in incidence of cancer of the tongue in the nordic countries continues into the twenty-first century. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(5):552-557.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med9&AN=22339663>.

2. Ng JH, Iyer NG, Tan M, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*. 2017;39(2):297-304.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med14&AN=27696557>.
  
3. Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Ricks S, Porter PL, Chen C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001;10(11):1137-1144.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11700261>.
  
4. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: A descriptive epidemiologic study. *Head Neck*. 2008;30(1):75-84.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med7&AN=17694557>.
  
5. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: Increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery*. 2000;122(1):44-51.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=10629481>.
  
6. Sim YC, Hwang J, Ahn K. Overall and disease-specific survival outcomes following primary surgery for oral squamous cell carcinoma: Analysis of consecutive 67 patients. *Journal of the Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeon*.

2019;45(2):83-90.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=pre3&AN=31106136>.

7. Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue.

*Cancer & Metastasis Reviews*. 2007;26(3-4):645-662.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=17768600>.

8. Suslu N, Hosal AS, Aslan T, Sozeri B, Dolgun A. Carcinoma of the oral tongue: A case series analysis of prognostic factors and surgical outcomes. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2013;71(7):1283-1290.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med10&AN=23522769>.

9. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th edition TNM classification for head and neck cancer. *Current Treatment Options in Oncology*. 2017;18(7):40.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med14&AN=28555375>.

10. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol*. 2010;46(9):630-635.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med8&AN=20637681>.

11. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape,



growth pattern, invasive front malignancy grading, martinez-gimeno score, and pathologic features. *Head Neck*. 2002;24(6):513-520.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=12112547>.

12. Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, et al. Predictors of locoregional recurrence in T1-2N0 tongue cancer patients. *Pathology Oncology Research*. 2013;19(4):795-803.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med10&AN=23677778>.

13. Elseragy A, Salo T, Coletta RD, et al. A proposal to revise the histopathologic grading system of early oral tongue cancer incorporating tumor budding. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(5):703-709.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med1&AN=30829728>.

14. Almangush A, Heikkinen I, Makitie AA, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017;117(6):856-866.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med14&AN=28751758>.

15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medc&AN=21376230>.

16. Bielenberg DR, Zetter BR. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2015;21(4):267-273.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222078>. doi:  
10.1097/PPO.0000000000000138.
  
17. Zwaans BMM, Bielenberg DR. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Res*. 2007;74(2-3):145-158.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=17950368>.
  
18. Sagheb K, Sagheb K, Rahimi-Nedjat R, Taylor K, Al-Nawas B, Walter C. Sentinel lymph node biopsy in T1/T2 squamous cell carcinomas of the tongue: A prospective study. *Oncology Letters*. 2016;11(1):600-604.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medp&AN=26870253>.
  
19. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: Myth or reality? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(3):462. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297234>.
  
20. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret G. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*. 2004;64(9):2941-2955.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=15126324>.

21. Audet N, Beasley NJ, MacMillan C, Jackson DG, Gullane PJ, Kamel-Reid S. Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology -- Head & Neck Surgery*. 2005;131(12):1065-1070.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=16365219>.
  
22. Carla C, Daris F, Cecilia B, Francesca B, Francesca C, Paolo F. Angiogenesis in head and neck cancer: A review of the literature. *Journal of Oncology Print*. 2012;2012:358472.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=prem1&AN=22131994>.
  
23. Sundov Z, Tomic S, Alfirovic S, et al. Prognostic value of MVD, LVD and vascular invasion in lymph node-negative colon cancer. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(123):432-438.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med10&AN=23321007>.
  
24. Halabi S, Owzar K. The importance of identifying and validating prognostic factors in oncology. *Semin Oncol*. 2010;37(2):9.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med8&AN=20494694>.
  
25. Almahmoudi R, Kasanen M, Sievilainen M, et al. Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review. *Cancer Science*. 2019;110(11):3424-3433.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medc&AN=31495050>.

26. Huang C, Sun Z, Sun Y, et al. Association of increased ligand cyclophilin A and receptor CD147 with hypoxia, angiogenesis, metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2012;60(5):793-803.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med9&AN=22320715>.

27. Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, et al. Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2506-2513.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med11&AN=24762957>.

28. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;46(12):2285-2294.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med8&AN=20570137>.

29. Shao Z, Zhang W, Chen X, Shang Z. Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with the angiogenesis and clinical outcome. *Oral Oncol*. 2008;44(12):1110-1117.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med7&AN=18485799>.

30. Forootan SS, Jones AS, Helliwell TR. Neoangiogenesis and squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Detection & Prevention*. 1999;23(2):137-146.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=10101595>.
31. Fernandez MM, Garcia-Rozado A, Parente PL. Is microvascular density an independent prognostic factor in squamous cell carcinoma of the tongue? *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007;58(8):341-346.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=17949660>.
32. Chuang H, Su C, Huang H, Chien C, Chen C, Huang C. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1175-1179.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=16826056>.
33. Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: Multivariate analysis. *J Surg Oncol*. 2003;82(1):34-50.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=12501167>.
34. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, et al. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer*. 2000;83(5):614-619.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=10944601>.

35. Al-Shareef H, Hiraoka S, Tanaka N, et al. Use of NRP1, a novel biomarker, along with VEGF-C, VEGFR-3, CCR7 and SEMA3E, to predict lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncol Rep.* 2016;36(5):2444-2454.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med13&AN=27666723>.

36. Yan J, Jiang Y, Ye M, Liu W, Feng L. The clinical value of lymphatic vessel density, intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 expression in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research & Therapeutics.* 2014;10(Suppl):125-130.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med11&AN=25450269>.

37. Seppala M, Pohjola K, Laranne J, et al. High relative density of lymphatic vessels predicts poor survival in tongue squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2016;273(12):4515-4524.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med13&AN=27328960>.

38. Ding L, Zhang Z, Shang D, et al. Alpha-smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2014;43(5):335-343.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med11&AN=24313357>.

39. Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, Nedzelskiene I, Pranys D, Tamelis A.

Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer.

*BMC Cancer*. 2009;9:95.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med7&AN=19323831>.

40. Salizzoni M, Romagnoli R, Lupo F, et al. Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemistry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplantation*. 2003;76(5):844-848.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=14501865>.

41. Saad RS, Luckasevic TM, Noga CM, Johnson DR, Silverman JF, Liu YL. Diagnostic value of HepPar1, pCEA, CD10, and CD34 expression in separating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2004;30(1):1-6.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=14696137>.

42. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):591-597.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=15166262>.

43. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: Comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(11):3410-3415.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11705856>.
44. Kumar S, Ghellal A, Li C, et al. Breast carcinoma: Vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999;59(4):856-861.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=10029075>.
45. Martone T, Rosso P, Albera R, et al. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol*. 2005;41(2):147-155.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=15695116>.
46. Schimming R, Marme D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2002;24(2):151-156.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11891945>.
47. Fohn LE, Rodriguez A, Kelley MC, et al. D2-40 lymphatic marker for detecting lymphatic invasion in thin to intermediate thickness melanomas: Association with sentinel lymph node status and prognostic value-a retrospective case study. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(2):336-345.



<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med8&AN=21238827>.

48. Agarwal D, Pardhe N, Bajpai M, et al. Characterization, localization and patterning of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinoma: A comparative study using D2-40 and CD-34 IHC marker. *Journal of Clinical and Diagnostic Research JCDR*. 2014;8(10):86.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=prem1&AN=25478456>.

49. Lee JA, Bae JW, Woo SU, Kim H, Kim CH. D2-40, podoplanin, and CD31 as a prognostic predictor in invasive ductal carcinomas of the breast. *Journal of Breast Cancer*. 2011;14(2):104-111.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=prem1&AN=21847404>.

50. He K, Sun J, Liu Z, et al. Prognostic significance of lymphatic vessel invasion diagnosed by D2-40 in chinese invasive breast cancers. *Medicine*. 2017;96(44):e8490.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med14&AN=29095309>.

51. Funayama A, Cheng J, Maruyama S, et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. *Pathobiology*. 2011;78(3):171-180.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med8&AN=21613804>.

52. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernandez P, Allonca E, Garcia-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: Tumorigenic role. *Oral Oncol.* 2013;49(6):598-603.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med10&AN=23473850>.
53. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol.* 2005;58(2):202-206.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med6&AN=15677543>.
54. Frech S, Hormann K, Riedel F, Gotte K. Lymphatic vessel density in correlation to lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(5):1675-1679.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med7&AN=19443385>.
55. Beasley NJP, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2002;62(5):1315-1320.  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11888898>.
56. Maula S, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res.*

2003;63(8):1920-1926.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=12702584>.

## Liitteet

### Liite 1. Itse julkaisu “*Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review*”

[Cancer Sci.](#) 2019 Nov; 110(11): 3424–3433.  
Published online 2019 Sep 30.  
doi: [10.1111/cas.14189](https://doi.org/10.1111/cas.14189)

PMCID: PMC6824997  
PMID: [31495050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31495050/)

## Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review

[Rabeia Almahmoudi](#),<sup>1,2</sup> [Merimajja Kasanen](#),<sup>1</sup> [Meri Sieviläinen](#),<sup>1</sup> [Abdelhakim Salem](#),<sup>1,2</sup> [Matti Pirinen](#),<sup>3,4,5</sup> [Tuula Salo](#),<sup>1,2,6,7,8</sup> and [Ahmed Al-Samadi](#)<sup>1,2</sup>

## Abstract

Tongue squamous cell carcinoma (TSCC) has a poor prognosis due to its early metastasis through blood and lymphatic vessels. We undertook a systematic review to investigate the prognostic significance of blood microvessel density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD) in TSCC patients. We carried out a systematic search in Ovid Medline, Scopus, and Cochrane libraries. All studies that evaluated the prognostic significance of MVD/LVD markers in TSCC were systematically retrieved. Our results showed that MVD/LVD markers, CD31, CD34, CD105, factor VIII, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1, and D2-40 were evaluated in TSCC patients until 28 June 2018. Six out of 13 studies reported markers that were associated with poor prognosis in TSCC. Two out of three studies suggested that a high number of D2-40<sup>+</sup> vessels predated low overall survival (OS); the third study reported that the ratio of D2-40<sup>+</sup> over factor VIII<sup>+</sup> vessels is associated with low OS. Most of the other markers had controversial results for prognostication. We found higher expression of MVD/LVD markers were commonly, but not always, associated with shorter survival in TSCC patients. It is therefore not currently possible to recommend implementation of these markers as reliable prognosticators in clinical practice. More studies (especially for D2-40) with larger patient cohorts are needed.

**Keywords:** biomarker, blood microvessel density, lymphatic vessel density, prognosis, tongue squamous cell carcinoma

## **Abbreviations**

CD cluster of differentiation  
 CI confidence interval  
 DFS disease-free survival  
 DSS disease-specific survival  
 FVIII factor VIII  
 HNSCC head and neck squamous cell carcinoma  
 HR hazard ratio  
 LN lymph node  
 LVD lymphatic vessel density  
 LYVE-1 lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1  
 MASTARI meta-analysis of statistics assessment and review instrument tool  
 MVD microvessel density  
 OS overall survival  
 PFS progression-free survival  
 PRISMA Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses  
 RDLV relative density of lymphatic vessels  
 REMARK reporting recommendations for tumor marker prognostic studies  
 RFS recurrence-free survival  
 TSCC tongue squamous cell carcinoma  
 VC vessel count  
 VEGF vascular endothelial growth factor

## **1. INTRODUCTION**

Tongue squamous cell carcinoma (TSCC) is one of the most common types of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and has an increasing incidence in many European and Nordic countries.<sup>1</sup> Cancer metastasis is the leading cause of death in TSCC patients. Unfortunately, the survival rate has not significantly improved over recent decades.<sup>2</sup> Cancer staging is considered a vital tool in predicting the treatment and survival outcomes of TSCC patients.<sup>3</sup> The TNM classification is currently the mainstay of clinical staging of TSCC patients.<sup>4</sup> Despite its widespread use, this system has been criticized for not considering the biological behavior and heterogeneity of individual cancers. For example, the TNM staging scheme shows little or no prognostic value in early TSCC.<sup>5, 6</sup> Therefore, it is important to supplement the TNM staging system with new histological features and biomarkers.<sup>7, 8</sup> TSCC currently lacks reliable prognosticators that can predict outcome and response to therapy.

Angiogenesis (new blood vessel formation) and lymphangiogenesis (new lymph vessel formation) are vital processes for tumor development and propagation.<sup>9</sup> These complex vasculature systems are essential not only for enriching tumor cells but also to facilitate the establishment of metastatic colonies in secondary tissues.<sup>9</sup> Almost all types of malignant carcinomas have the potential to metastasize to regional lymph nodes and distant tissues.<sup>10</sup> In fact, some cancers metastasize by utilizing both the blood and

lymphatic vessels simultaneously, whereas others, such as TSCC, prioritize spreading through lymphatic routes to the sentinel lymph nodes.<sup>9, 11</sup> In this context, both MVD and LVD were successfully used as parameters to study the tumor biology, prognosticators, and therapeutic targets in several cancers including HNSCC.<sup>12, 13, 14, 15</sup> The assessment of such vascular parameters is often facilitated by the use of well-established immunohistochemical antibodies (Abs). These Abs include a variety of blood vessel markers, such as CD34, CD31, CD105 (endoglin), and FVIII in addition to markers for lymphatic vessels, such as D2-40 (podoplanin) and LYVE-1.

Assessment of prognostic parameters at the time of diagnosis is essential for proper risk stratification of cancer patients.<sup>16</sup> To the best of our knowledge, there are currently no biomarkers that reliably correlate with the prognosis and therapeutic response in TSCC patients. Several studies have investigated the potential of the tumor vasculature as a prognosticator in TSCC. Therefore, in this study we sought to systematically review the current evidence of the prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in patients with TSCC.

## 2. METHODS

### 2.1. Protocol and registration

This review study was registered at the international prospective register of systematic reviews PROSPERO (<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>) with the registration number CRD42019115141.

### 2.2. Search strategy

We carried out a comprehensive search in 3 electronic databases (Ovid Medline, Scopus, and Cochrane Library) combining the following search terms: (“tongue”) AND (“cancer” OR “neoplasm” OR “carcinoma” OR “squamous cell carcinoma” OR “tumor\*”) AND (“angiogenesis” OR “blood vessel” OR “lymphangiogenesis” OR “lymphatic vessel” OR “lymph vessel” OR “cd31\*” OR “cd34\*” OR “cd45\*” OR “icam-1\*” OR “cd54\*” OR “lyve-1\*” OR “tie-2\*” OR “tek\*” OR “vcam-1\*” OR “cd106\*” OR “ve cadherin” OR “vegf-r2” OR “vascular endothelial growth factor receptor 2” OR “FVIII-RA” OR “FVIII” OR “factor 8” OR “von willebrand factor” OR “vwf” OR “erg” OR “vegf” OR “d2-40” OR “podoplanin” OR “prospero-related homeobox-1” OR “vegf-r3” OR “peripheral node addressin antibody”). Both the abbreviated and full name of each vessel marker were used.

The results obtained with these search terms were gathered together in RefWorks. The article search was undertaken with no time/language restrictions on 28 June 2018 and therefore articles published after that date were not considered. The PRISMA was used to illustrate the results in a flowchart of search.<sup>17</sup> In the Ovid Medline advanced search, the set search fields were: abstract, original title, subject heading, keyword.

If the same patient cohort was involved in multiple publications, only the most recent study was included. Two authors (R.A. and M.K.) independently screened all article titles and abstracts. In the screening, duplicates were discarded and articles were

verified to meet the inclusion criteria listed in Table [S1](#). Articles not passing the inclusion criteria were excluded during the screening process.

### 2.3. Data extraction

The following information was extracted from each study: (i) basic article information, including first author, publication year, study period, and follow-up duration; (ii) patient and tumor information, including the number and location of patients, mean age, gender, tumor site and size, disease stage, number of patients who underwent immunohistochemical staining and the number with positive staining results, name and source of the Ab, Ab dilution, and sample preservation (paraffin-embedded or frozen); (iii) survival analysis, including type of survival, end-point, Kaplan-Meier curves and statistical results (estimated HR, 95% CI, and *P*values); and (iv) variables measuring vessel marker expression, including lymphatic or blood vessel density, location of the staining, and cut-off value as a definition for positive expression.

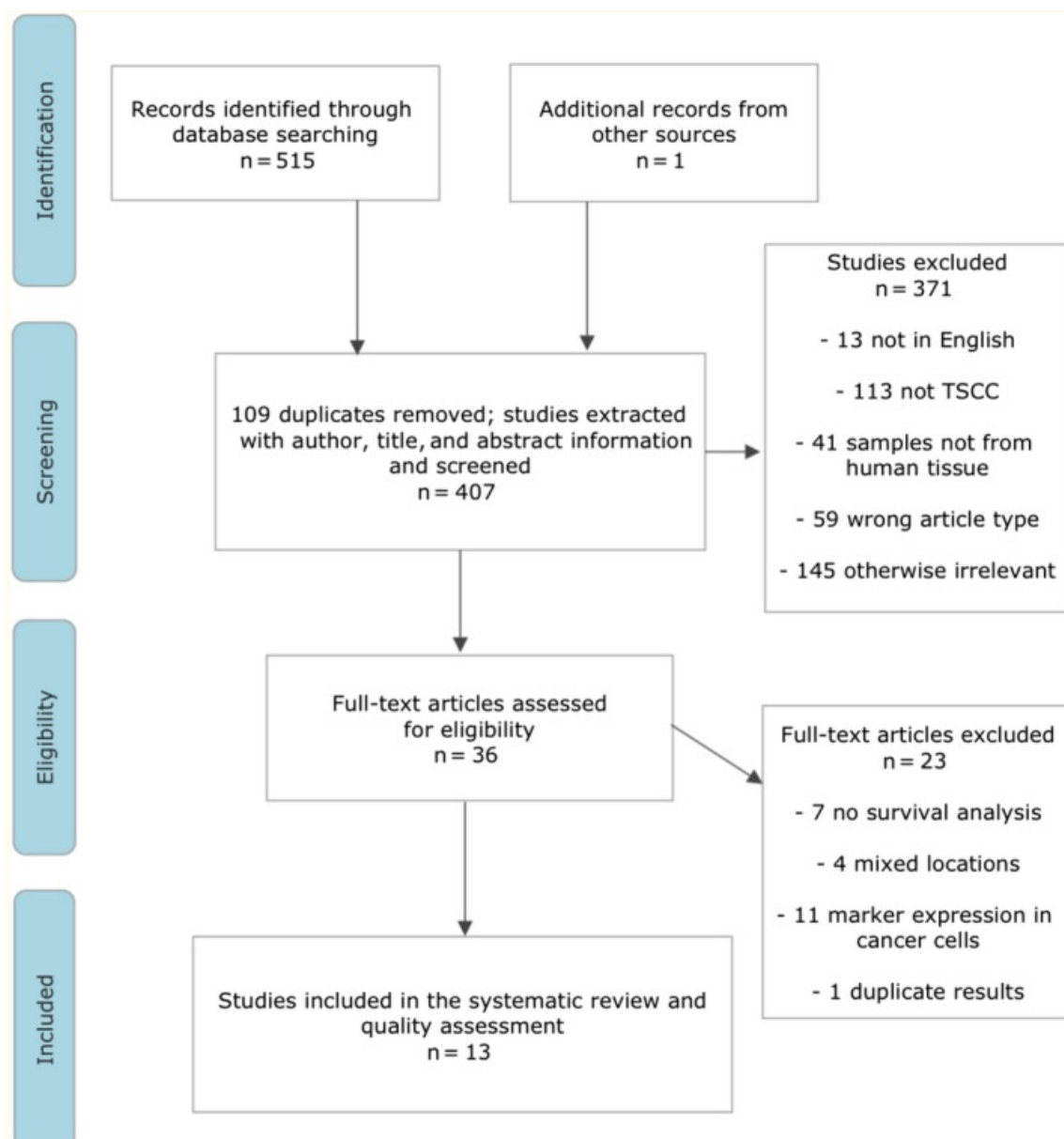
### 2.4. Quality and risk of bias assessment

We assessed the reporting quality of the eligible studies according to the REMARK guidelines, a 20-item checklist aimed at ensuring the quality and reproducibility of the reported data.<sup>18</sup> The selected and applied REMARK guidelines of the eligible studies are listed in Table [S2](#). For the risk of bias, two authors (R.A. and M.K.) answered 10 questions for each study using MASTARI. Answers were described as Y for “yes,” N for “no,” U for “unclear,” and NA for “not applicable”. The risk of bias was categorized as high when the study reached up to 49% of a “yes” score, moderate when the study reached a 50%-69% of a “yes” score, and low when the study reached more than 70% of a “yes” score.

## 3. RESULTS

### 3.1. Search results

We found a total of 515 articles from 3 electronic databases (332 from Ovid Medline, 142 from Scopus, and 41 from the Cochrane Library) and 1 from a previous search. After screening titles and abstracts, 36 articles were subsequently verified for eligibility (Figure [1](#)). Of these, only 13 articles met the inclusion criteria and were therefore included in this review. In these studies, samples from patients with TSCC were used to evaluate the following vessel markers: CD34, CD31, CD105, FVIII, D2-40, and LYVE-1. For MVD markers, CD34 analysis was reported in 5 studies<sup>19, 20, 21, 22, 23</sup>; Fernández et al studied CD31 and Chuang et al studied CD105.<sup>24, 25</sup> Factor VIII was evaluated in 2 studies.<sup>26, 27</sup> For LVD markers, D2-40 was evaluated in 3 studies<sup>28, 29, 30</sup> and LYVE-1 was reported in 2 studies.<sup>21, 31</sup> The end-point measurement was reported as OS in 4 studies.<sup>19, 22, 29, 31</sup> In addition, the outcome was also reported as PFS,<sup>20</sup> DFS,<sup>21, 25, 28</sup> DSS,<sup>24, 27, 30</sup> RFS,<sup>26</sup> and tumor-specific survival.<sup>23</sup>



**Figure 1**

Flow chart defining the search strategy and the studies included and excluded along various steps. TSCC, tongue squamous cell carcinoma

### 3.2. Risk of bias results

Based on the MASTARI evaluation tool, the risk of bias in the included articles was either low ( $n = 9$ ) or moderate ( $n = 4$ ). The risk of bias for each study and the applied questions are shown in Table [S3](#).

### 3.3. Preoperative treatments of the studied cohorts

As the preoperative treatment could impact the expression of MVD/LVD in the studied patient samples, we screened the included reports to extract any relevant data. The

samples were not subjected to any sort of preoperative treatments in a total of 7 studies.<sup>19, 20, 21, 22, 25, 29, 31</sup> In one study from India, the patients were primarily treated by either surgery or radiotherapy.<sup>26</sup> Some of the patients who underwent surgery were also given adjuvant radiotherapy, chemotherapy, or radiotherapy and chemotherapy.<sup>26</sup> However, this information was either missing or not clearly stated in the other 5 studies.<sup>23, 24, 27, 28, 30</sup>

### 3.4. Microvessel density markers as prognosticators in TSCC

#### 3.4.1. Prognostic value of CD34

We found 5 studies that analyzed the prognostic value of CD34 in TSCC patients. Huang et al<sup>19</sup> did not find a statistically significant correlation between MVD (determined by CD34) and OS in a cohort of 80 TSCC patients. This was similar to the results of Toyoda et al,<sup>20</sup> who reported no significant correlation between CD34 expression and OS or PFS in a similar sample size (n = 85). In contrast, Sasahira et al<sup>21</sup> revealed that high CD34 expression was associated with poor prognosis and reduced DFS when they analyzed 101 TSCC patients ( $P = .0249$ ). Similarly, Shao et al<sup>22</sup> reported a significantly reduced OS in TSCC patients (n = 59) with high CD34 expression compared with those with low or moderate expression. In an older study of Forootan et al,<sup>23</sup> the CD34-expressing vessel count (VC) was not associated with the growth pattern or metastasis in a cohort of 51 TSCC patients. However, the Cox proportional hazards model revealed that patients with a low VC tended to have a good prognosis ( $P = .023$ ). Characteristics of the studies on CD34 are summarized in Table 1.

**Table 1**

Characteristics of studies of CD34 in tongue squamous cell carcinoma

First author, year, country	Stage or tumor size	Primary Ab	Method for MVD evaluation	Cut-off point	No. of cases in IHC	Positive cases	End-point	Unadjusted analysis	Adjusted analysis	Results interpretation	Compliance to REMARK guidelines
Huang et al, 2012, China	T1-T4	CD34 mouse mAb, Abcam, 1:200	MVD was counted in 5 hot spots in a 200× field	>47	80	46.25%	OS	$P = .427$	—	MVD had no significant effect on OS	Checklist number 1, 5 and 6 not fulfilled
Toyoda et al, 2014, Japan	T1-T4	CD34 mouse mAb, Nichirei, 1:800	MVD was counted in 4 hot spots in a 400× field (0.26 mm <sup>2</sup> field area)	14 (range 2-29)	85	52%	OS PFS	$P = .182$ $P = .617$	—	MVD had no significant correlation on OS/PFS	Checklist number 5 not fulfilled
Sasahira et al, 2010, Japan	T1-T4	CD34, Dako	MVD was counted in 5 hot spots in a 200× field	54.65 ± 37.67 (mean as cut-off value ± SD)	101	—	DFS	$P = .0249$	—	MVD was significantly associated with local progression, clinical stage, nodal metastasis, and DFS	Checklist numbers 1, 3, and 5 not fulfilled
Shao et al, 2008, China	T1-T4	CD34, mAb, ZYMED, 1:200	MVD was counted in 5 hot spots in a 200× field	78.73 ± 25.73 (mean as cut-off value)	59	—	OS	HR 5.2 (95% CI, 1.78-19.23), $P = .020$	HR 0.24 (95% CI, 0.00-0.87), $P = .01$	MVD was significantly associated with OS and had independent prognostic effect on OS	Fulfilled all of REMARK criteria
Forootan et al, 1999, UK	T1-T4	CD34, mouse mAb, Dako	MVD was counted in the highest hot spots in a 250× field	35 (median as cut-off value)	51	10 cases had VC < 20	TSS	$P = .178$	$P = .0234$	On univariate analysis there was no significant association between MVD and survival. Cox's regression showed that a low value of VC is a good prognostic sign	Checklist numbers 3 and 5 not fulfilled

\* $P$  value ≤ .05.

—, not disclosed; CD, cluster of differentiation; CI, confidence interval; DFS, disease-free survival; HR, hazard ratio; IHC, immunohistochemistry; MVD, microvascular density; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; REMARK, reporting recommendations for tumor marker prognostic studies; TSS, tumor-specific survival; VC, vascular count.



### 3.4.2. Prognostic value of CD31 and CD105

We found only one study that used CD31 to correlate MVD and the prognosis of 43 patients with TSCC.<sup>24</sup> In this small cohort study, Cox regression analysis did not indicate tumor vascularization as a prognostic factor of survival ( $P = .59$ ). Chuang et al<sup>25</sup> investigated the expression of CD105 in 94 TSCC patients and found that the cumulative 5-year DFS rates of patients with low CD105 expression were significantly higher than those with high expression ( $P < .001$ ). Moreover, Cox regression analysis showed that the expression of CD105 was an independent factor from other variables for survival (relative risk 8.0; 95% CI, 2.525-25.839;  $P < .001$ ). Characteristics of the studies regarding these 2 markers are summarized in Table 2.

**Table 2**  
Characteristics of studies regarding CD31/CD105 markers in tongue squamous cell carcinoma

First author, year, country	Stage or tumor size	Primary Ab	Method for MVD evaluation	Cut-off point	No. of cases in IHC	Positive cases	End-point	Unadjusted analysis	Adjusted analysis	Results interpretation	Compliance to REMARK guidelines
Fernández et al, 2007, Spain	T1-T4	CD31 mAb, Dako, 1:10	MVD was counted in 3 hot spots in a 400× field (0.369 mm <sup>2</sup> per field)	30.6	43	43	5 y DSS	$P = .59$	–	There was no significant correlation between MVD and 5-y survival	Checklist numbers 5 and 6 not fulfilled
Chuang et al, 2006, Taiwan	T1-T2	CD105 (SN6h) mouse mAb, Dako, 1:10	MVD was counted in hot spots in a 200× field	18.8	94	27	5 y DFS	$P < .001$	RR 8.077 (95% CI, 2.525-25.839), $P < .001$	CD105 was an independent prognostic factor for survival	Checklist number 5 not fulfilled

\* $P$  value  $\leq .05$ .  
–, not disclosed; CD, cluster of differentiation; CI, confidence interval; DFS, disease-free survival; DSS, disease-specific survival; IHC, immunohistochemistry; MVD, microvessel density; REMARK, reporting recommendations for tumor marker prognostic studies; RR, relative risk.

### 3.4.3. Prognostic value of FVIII

A series of 84 TSCC cases were enrolled in a study by Vora et al.<sup>26</sup> The authors considered a mean of the number of microvessels from 3 vascular hot spots as representing the microvessel count for each patient. Early stage (stage I and II) cancer patients with FVIII greater than 0.0 were significantly associated with reduced OS and RFS. However, FVIII lost its prognostic significance when a general linear model was applied.<sup>26</sup> In the other study, Kantola et al<sup>27</sup> reported no association between FVIII and the survival rate in a cohort of 105 TSCC patients. Further information is summarized in Table 3.

**Table 3**  
Characteristics of studies regarding factor VIII (FVIII) markers in tongue squamous cell carcinoma

First author, year, country	Stage or tumor size	Primary Ab	Method for MVD evaluation	Cut-off point	No. of cases in IHC	Positive cases	End-point	Unadjusted analysis	Adjusted analysis	Results interpretation	Compliance to REMARK guidelines
Vora et al, 2003, India	T1-T4	FVIII mouse mAb, clone F8/36, Dako, 1:50	MVD was counted in 3 hot spots in a 400× field	Median 0.0	84	20%	RFS OS	$P = .032$ $P = .014$	–	MVD was associated with RFS and OS	Checklist numbers 2 and 5 not fulfilled
Kantola et al, 2000, Finland	I-II I II-IV	FVIII Dako	MVD was counted in 10 hot spots in a 40× field (diameter 400 µm)	$\geq 8.5$	105	–	75% DSS survival time	$P = .27$	–	No significant correlation was found between FVIII and survival	Checklist numbers 1, 3, and 5 not fulfilled

\* $P$  value  $\leq .05$ .  
–, not disclosed; DSS, disease-specific survival; IHC, immunohistochemistry; MVD, microvessel density; OS, overall survival; REMARK, reporting recommendations for tumor marker prognostic studies; RFS, relapse-free survival.

## 3.5. Lymphatic vessel density markers as prognosticators in TSCC

### 3.5.1. Prognostic value of D2-40

Al-Shareef et al<sup>28</sup> revealed a strong correlation between D2-40 and LN metastasis in 80 TSCC patients. Both OS and DFS were associated with intra- and peritumoral LVD, as patients with a high LVD had a poor prognosis with a high possibility of recurrence. A significant reduction in OS was observed by Yan et al<sup>29</sup> in 80 TSCC cases associated with high D2-40, which also indicated higher nodal metastasis. In the 61 cases analyzed by Seppälä et al,<sup>30</sup> the mean LVD did not influence patient survival. However, the relative density of lymphatic vessels (RDLV) was significantly associated with poor OS

( $P = .004$ ) in TSCC patients. The authors calculated RDLV by dividing the mean number of D2-40<sup>+</sup> LVD by the mean number of von Willebrand factor<sup>+</sup> LVD per microscopic field. These studies are summarized in Table 4.

**Table 4**  
Characteristics of studies regarding D2-40 in tongue squamous cell carcinoma (TSCC)

First author, year, country	Stage or tumor size	Primary Ab	Method for LVD evaluation	Cut-off point	No. of cases in IHC	Positive cases	End-point analysis	Unadjusted analysis	Adjusted analysis	Results interpretation	Compliance to REMARK guidelines
Al-Shawaf et al, 2016, Japan	T1-T4	D2-40 mouse mAb, prediluted, Nichirei Bioscience	LVD was counted in 3 hot spots using a 20× objective	Mean 6.85 vessels/mm <sup>2</sup>	80	100%	OS	<sup>a</sup> $P < .001$	—	There was a significant correlation between LVD and LN metastasis in TSCC. Patients with a high LVD had a poor DFS and a high recurrence rate	Checklist numbers 1, 3, and 5 not fulfilled
Yan et al, 2014, China	I-II III-IV	D2-40, mAb (ZM-0465), Zhengzhou Goldenbridge Biotechnology, 1:100	LVD was counted in 3 hot spots in 200× field	Mean (21.454 ± 7.022)	80	100%	OS	<sup>a</sup> $P < .0001$	—	OS was significantly shorter in patients with high LVD. D2-40 expression was higher in OTSCC than in normal tissue	Checklist number 5 not fulfilled
Seppälä et al, 2016, Finland	T1-T4	D2-40 mAb, Dako, 1:50	LVD was counted in 5 hot spots (0.785 mm <sup>2</sup> /field)	Mean 16.6/field	61	—	OS DSS	NS NS	—	Mean LVD and lymph vessel diameter had no significant effect on patient OS or DSS	Checklist numbers 1 and 5 not fulfilled

<sup>a</sup>  $P$  value ≤ .05.  
—, not disclosed; DFS, disease-free survival; DSS, disease-specific survival; IHC, immunohistochemistry; LN, lymph node; LVD, lymphatic vessel density; NS, not significant; OS, overall survival; REMARK, reporting recommendations for tumor marker prognostic studies; OTSCC, oral tongue squamous cell carcinoma.

### 3.5.2. Prognostic value of LYVE-1

Ding et al<sup>31</sup> evaluated the prognostic value of LYVE-1 in 50 cases and revealed fewer intratumoral LYVE-1<sup>+</sup> vessels than peritumoral vessels. Moreover, they did not observe a significant correlation between LYVE-1 and OS of TSCC patients. In contrast, Sasahira et al<sup>21</sup> revealed that LVD positive for LYVE-1 showed a poor association with DFS in 101 TSCC patients. In addition, high LVD was associated with poor prognosis ( $P < .0001$ ). Both studies are summarized in Table 5

**Table 5**  
Characteristics of studies regarding LYVE-1

Authors, year, Country	Stage or tumor size	Primary antibody	Method for evaluation LVD	Cutoff point	No. of cases in IHC	Positive cases	End-point analysis	Unadjusted analysis	Adjusted analysis	Results interpretations	Compliance to REMARK guidelines
1. Ding et al, 2014, China	T1-T4	LYVE1 polyclonal, Abcam, 1:100	LVD was counted in six hot spots in 200× field	IT 3 (range 0-10) PT 5 (range 0-20)	50	38%	OS	HR: 1.604 (95% CI: 0.650-3.960) $P = .305$	HR: 1.524 (95% CI: 0.551-4.210) $P = .417$	There was no significant correlation between the expression of LYVE-1 and OS of patients with OTSCC	Fulfilled all of remark criteria
2. Sasahira et al, 2010, Japan	T1-T4	LYVE-1, Dako	LVD was counted in five hot spots in 200× field	104.24 ± 64.23 (Mean ± SD)	101	—	DFS	$P < .0001$ <sup>a</sup>	—	LVD was significantly associated with DFS. Significant relationship was found between LVD and gender, histological differentiation, local progression, clinical stage, lymph node metastasis and local recurrence	Checklist number 1,3 and 5 not fulfilled

Abbreviations: —, Not disclosed; CI, confidence interval; DFS, disease free survival; HR, hazard ratio; IT, intratumour; LVD, lymphatic vessels density; LYVE1, Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; OS, overall survival; PT, peritumour.  
<sup>a</sup>  $P$  value ≤ .05.

## 4. DISCUSSION

Angiogenesis and lymphangiogenesis promote cancer cell growth and metastasis.<sup>14</sup> Metastasis is estimated to be responsible for approximately 90% of cancer-associated deaths.<sup>32</sup> TSCC is one of the most common intraoral cancers and is characterized by an extensive and well-developed vascular and lymphatic system and a high rate of cervical LN metastasis.<sup>33</sup> Therefore, identification of biomarkers that associate with TSCC progression and metastasis, such as MVD and LVD, could enhance prognostic and therapeutic approaches. In the present study, several MVD and LVD markers were reviewed in 13 clinical studies that involved a total of 973 TSCC patients. Only 7 of the eligible 13 studies (53.84%) indicated a prognostic significance of one or more of the studied MVD or LVD markers. The results of almost all markers were controversial. However, studies on D2-40 suggested some promising results. The use of these MVD and LVD markers cannot be recommended for clinical use at this time and more studies (especially on D2-40) are needed with a larger number of TSCC cases.

Several reports indicate that CD34 can be used as a specific and sensitive biomarker in hepatocellular carcinoma and lung cancer and could therefore become an integral part of a more reliable staging system.<sup>34, 35, 36</sup> Moreover, the use of CD34 as an angiogenic

marker was superior to other markers as it yielded better results with less background and makes quantification easier.<sup>23</sup> In TSCC, the vascular hot spots were also positively correlated with tumor size; multivariate analysis showed better prognosis in patients with low CD34 expression.<sup>23</sup> Additionally, Sasahira et al<sup>21</sup> showed that higher CD34 expression strongly correlated with poor survival. It was also reported by Shao et al<sup>22</sup> that CD34 positively correlated to VEGF and to poor survival of TSCC patients. This reflects the key role of VEGF in the development of a functional vascular system in the tumor microenvironment. However, two later studies were not able to reproduce the significance of CD34 as a prognostic marker in TSCC patients.<sup>19, 20</sup>

CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), CD105 (endoglin), FVIII, and von Willebrand factor are other blood vessel markers. Even though CD31, FVIII, and CD105 are determinants of MVD, it was concluded that CD105 expression is the best angiogenic marker and significant prognosticator of DFS in non-small cell lung cancer patients.<sup>37</sup> Moreover, several reports have found a positive correlation between CD105<sup>+</sup> MVD and cancer cell metastasis, including in HNSCC patients.<sup>38, 39</sup> Advanced oral cancer stages correlated with higher expression of CD105.<sup>40</sup> CD31 and CD105 have thus far been studied only once in TSCC patients. Although the expression of CD105 was reported to be an independent prognostic factor for survival by multivariate analysis according to the Cox regression model,<sup>25</sup> prognostic value was not found when CD31 was assessed. This might be due to the small sample size in their study.<sup>24</sup> There are two studies of FVIII in TSCC that reported contradictory results.<sup>26, 27</sup>

D2-40 (podoplanin), a mucin-type transmembrane glycoprotein, is preferentially expressed in lymphatic endothelial cells and is considered a specific marker for the lymphatic endothelium.<sup>30, 41</sup> The tumorigenic role of podoplanin has been suggested in several reports based on its high expression in potentially malignant lesions such as oral leukoplakia, oral carcinoma in situ, and oral squamous cell carcinoma.<sup>42, 43</sup> The TSCC samples with high D2-40<sup>+</sup> LVD expression showed significant prognostic value in two studies.<sup>28, 29</sup> Although LVD did not produce a significant correlation with patient survival in the third study, RDLV was instead significantly associated with poor OS in TSCC patients.<sup>30</sup> However, these results should be confirmed with studies in a larger patient cohort.

Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 is another specific marker for lymphatic endothelium.<sup>44</sup> A significant relationship was found between intratumoral LVD expression and LN metastasis in HNSCC.<sup>45</sup> In another study, Beasley et al<sup>46</sup> revealed discrete hot spots of intratumoral LYVE-1<sup>+</sup> lymphatics in all HNSCC cases, which were associated with cervical LN involvement. Consistent with this, intratumoral LYVE-1<sup>+</sup> LVD in 97 primary HNSCC tumors increased risk for local relapse and indicated poor disease-specific prognosis.<sup>47</sup> In a study by Sasahira et al,<sup>21</sup> LYVE-1<sup>+</sup> LVD were found at the edges of the TSCC tissues and the vessels were irregular in shape, and when accompanied with high VEGF showed shorter DFS. In a later study by Ding et al,<sup>31</sup> there was no correlation between the expression of neither intratumoral nor peritumoral LYVE-1 and the survival of patients with TSCC.

In conclusion, although the evidence reported in this review suggests that increased expression of MVD or LVD markers for TSCC patients could be associated with reduced survival, there is currently insufficient evidence to recommend implementation of any of these markers as part of a reliable staging system in clinical practice. This is due to several factors, such as the small patient cohorts of the studies, different assessment criteria used for MVD and LVD markers, the heterogeneity of the study

samples (mixing either base of the tongue “posterior 1/3”, oral tongue “anterior 2/3,” or total tongue cancer for the analysis), and the absence of HR and CI information in the majority of the studies (11 of 13 studies). Overall, this review highlights the need for more accurate prognostic studies on TSCC.

## DISCLOSURE

The authors declare no conflicts of interest for this article.

## Supporting information

**Table S1. Inclusion and exclusion criteria**

Inclusion criteria	Exclusion criteria
<ul style="list-style-type: none"> <li>Tissue samples from human cohort</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>The retrieved records were:               <ul style="list-style-type: none"> <li>case reports</li> <li>reviews</li> <li>letters</li> <li>book chapters</li> <li>conference abstracts</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Patients diagnosed with TSCC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Articles in language other than English</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Assessment of association between the expression of blood/lymphatic vessel markers and the clinical features and/or the survival outcomes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Articles with mixed results from tongue and other subsites</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Articles in which results were based on animal models or tests</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Studies lacking data of the correlation between clinical features and/or survival outcomes</li> </ul>

**Table S2. Evaluation criteria used to assess the quality of studies\***

Checklist	Criteria
<b>1-Patient samples</b>	Retrospective or prospective cohort with a well-defined study population with information such as the number of the studied patients, source of sample, study period, follow-up time. Authors explained the medical treatment(s) applied to the patients and clarified if all of the patients received the same treatment or not.
<b>2-Clinical data of the cohort</b>	The basic clinical data including gender, age, clinical stage of cancer and histopathological grade, was provided.
<b>3-Immunohistochemistry</b>	Well-described staining protocol or referred to original paper with information such as primary antibody name, dilution, company. The cut-off value of the area stained after which it is to be considered positive, was well described.
<b>4- Prognostics</b>	The endpoints of the survival analyses were defined (e.g. overall survival, disease-free survival).
<b>5- Statistics</b>	Estimated effects (HR, CI) were describing the relationship between the evaluated checkpoint and the outcome was provided. Adequate statistical analysis (e.g. Cox regression modelling) was performed to adjust the estimation of the effect of the biomarker for known prognostic factors.
<b>6- Classical prognostic factors</b>	The prognostic value of the classical prognostic factors was reported. The relationship between the evaluated immune checkpoint(s) and classical prognostic factors were reported.

Table S3. Risk of bias assessment

Studies	Questions*										% Yes*	Risk of bias
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10		
Huang et al (2011)	Y	Y	Y	U	N	U	Y	NA	NA	Y	62.50	M
Toyoda et al (2014)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	NA	Y	100	L
Sasahira et al (2010)	Y	Y	Y	U	N	U	Y	NA	NA	Y	62.50	M
Shao et al (2008)	Y	Y	Y	Y	U	Y	U	NA	NA	Y	75	L
Fernandez et al (2007)	Y	Y	Y	Y	N	Y	U	NA	NA	Y	75	L
Al-Shareef et al (2016)	Y	Y	N	Y	U	Y	U	NA	NA	Y	62.50	M
Yan et al (2014)	Y	Y	Y	Y	U	Y	Y	NA	NA	N	75	L
Seppälä et al (2016)	Y	Y	Y	Y	U	Y	Y	NA	NA	Y	87.50	L
Vora et al (2003)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NA	NA	Y	87.50	L
Kantola et al (2000)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NA	NA	Y	87.50	L
Chuang et al (2006)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NA	NA	Y	87.50	L
Ding et al (2014)	Y	N	N	N	Y	Y	Y	NA	NA	Y	62.50	M
Forootan et al (1999)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	NA	Y	87.50	L

Q1. Were there clear criteria for inclusion in the case series?

Q2. Was the condition measured in a standard, reliable way for all participants included in the case series?

Q3. Were valid methods used for identification of the condition for all participants included in the case series?

Q4. Did the case series have consecutive inclusion of participants?

Q5. Did the case series have complete inclusion of participants?

Q6. Was there clear reporting of the demographics of the participants in the study?

Q7. Was there clear reporting of clinical information of the participants?

Q8. Were the outcomes or follow-up results of cases clearly reported?

Q9. Was there clear reporting of the presenting site(s)/clinic(s) demographic information?

Q10. Was statistical analysis appropriate?

\*Y=Yes, N=No, U=Unclear, NA=Not applicable (which was not considered on the percentage calculation)

# Risk of bias was categorized as high when the study reaches up to 49% score “yes”, moderate when the study reached 50% to 69% score “yes”, and low when the study reached more than 70% score “yes”.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Tiina Heino and Katri Larmo for assisting with the systematic search. The authors acknowledge the funders of this study: the Doctoral Program in Clinical Research, University of Helsinki; the Cancer Society of Finland; the Emil Aaltonen Foundation (Emil Aaltosen Säätiö); the Finnish Dental Society (Apollonia); the Sigrid Jusélius Foundation, the Oulu University Hospital MRC grant; and the Helsinki University Central Hospital research funds.

## Notes

Almahmoudi R, Kasanen M, Sieviläinen M, et al. Prognostic value of blood and lymphatic vessel markers in tongue cancer: A systematic review. *Cancer Sci.* 2019;110:3424-3433. 10.1111/cas.14189 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

Salo and Al-Samadi supervised the work equally.

## REFERENCES

1. Annertz K, Anderson H, Palmér K, Wennerberg J. The increase in incidence of cancer of the tongue in the Nordic countries continues into the twenty-first century. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(5):552-557. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Sim YC, Hwang JH, Ahn KM. Overall and disease-specific survival outcomes following primary surgery for oral squamous cell carcinoma: analysis of consecutive 67 patients. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2019;45(2):83-90. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol.* 2010;46(9):630-635. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th edition TNM classification for head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(7):40. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck.* 2002;24(6):513-520. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, et al. Predictors of locoregional recurrence in T1-2N0 tongue cancer patients. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(4):795-803. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2017;117(6):856-866. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Elseragy A, Salo T, Coletta RD, et al. A proposal to revise the histopathologic grading system of early oral tongue cancer incorporating tumor budding. *Am J Surg Pathol.* 2019;43(5):703-709. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Bielenberg DR, Zetter BR. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer J.* 2015;21(4):267-273. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Zwaans BM, Bielenberg DR. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Res.* 2007;74(2-3):145-158. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Sagheb K, Sagheb K, Rahimi-Nedjat R, Taylor K, Al-Nawas B, Walter C. Sentinel lymph node biopsy in T1/T2 squamous cell carcinomas of the tongue: a prospective study. *Oncol Lett.* 2016;11(1):600-604. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* 2004;64(9):2941-2955. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Audet N, Beasley NJ, MacMillan C, Jackson DG, Gullane PJ, Kamel-Reid S. Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;131(12):1065-1070. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]



14. Carla C, Daris F, Cecilia B, Francesca B, Francesca C, Paolo F. Angiogenesis in head and neck cancer: a review of the literature. *J Oncol*. 2012;2012:358472. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Sundov Z, Tomic S, Alfirevic S, et al. Prognostic value of MVD, LVD and vascular invasion in lymph node-negative colon cancer. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(123):432-438. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Halabi S, Owzar K. The importance of identifying and validating prognostic factors in oncology. *Semin Oncol*. 2010;37(2):e9-e18. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group . Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA Statement. *Open Med*. 2009;3(3):e123-e130. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics . Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer*. 2005;93(4):387-391. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Huang C, Sun Z, Sun Y, et al. Association of increased ligand cyclophilin A and receptor CD147 with hypoxia, angiogenesis, metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2012;60(5):793-803. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, et al. Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2506-2513. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;46(12):2285-2294. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Shao Z, Zhang WF, Chen XM, Shang ZJ. Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: correlation with the angiogenesis and clinical outcome. *Oral Oncol*. 2008;44(12):1110-1117. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Forootan SS, Jones AS, Helliwell TR. Neoangiogenesis and squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Detect Prev*. 1999;23(2):137-146. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Fernández MM, García-Rozado A, Parente PL. Is microvascular density an independent prognostic factor in squamous cell carcinoma of the tongue? *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007;58:341-346. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Chuang HC, Su CY, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1175-1179. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol*. 2003;82(1):34-50. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

27. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, et al. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer*. 2000;83(5):614-619. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Al-Shareef H, Hiraoka SI, Tanaka N, et al. Use of NRP1, a novel biomarker, along with VEGF-C, VEGFR-3, CCR28 and SEMA3E, to predict lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncol Rep*. 2016;36(5):2444-2454. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Yan J, Jiang Y, Ye M, Liu W, Feng L. The clinical value of lymphatic vessel density, intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 expression in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(suppl):C125-C130. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Seppälä M, Pohjola K, Laranne J, et al. High relative density of lymphatic vessels predicts poor survival in tongue squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(12):4515-4524. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Ding L, Zhang Z, Shang D, et al.  $\alpha$ -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(5):335-343. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-1564. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, et al. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012;9(5):329-335. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Salizzoni M, Romagnoli R, Lupo F, et al. Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemistry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplantation*. 2003;76(5):844-848. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Saad RS, Luckasevic TM, Noga CM, Johnson DR, Silverman JF, Liu YL. Diagnostic value of HepPar1, pCEA, CD10, and CD34 expression in separating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2004;30(1):1-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):591-597. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res*. 2001;7(11):3410-3415. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Kumar S, Ghellal A, Li C, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999;59(4):856-861. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Martone T, Rosso P, Albera R, et al. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol*. 2005;41(2):147-155. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Schimming R, Marmé D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2002;24(2):151-156. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]



41. Agarwal D, Pardhe N, Bajpai M, et al. Characterization, localization and patterning of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinoma: a comparative study using D2-40 and CD-34 IHC marker. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(10):ZC86-ZC89. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. *Oral Oncol.* 2013;49(6):598-603. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Funayama A, Cheng J, Maruyama S, et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. *Pathobiology.* 2011;78(3):171-180. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
44. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol.* 2005;58(2):202-206. *er.* 2000 Sep;83(5):614-9. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Frech S, Hörmann K, Riedel F, Götte K. Lymphatic vessel density in correlation to lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(5):1675-1679. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2002;62(5):1315-1320. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Maula SM, Luukkaa M, Grénman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamäki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res.* 2003;63(8):1920-1926. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

## Liite 2. MASTARI-menetelmän tulokset ja kysymykset

Julkaisu	Kysymykset*										% kyllä*	Harha- riski
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q 10		
Huang (2011)	Y	Y	Y	U	N	U	Y	NA	NA	Y	62,50	M
Toyoda (2014)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	NA	Y	100	L
Sasahira (2010)	Y	Y	Y	U	N	U	Y	NA	NA	Y	62,50	M
Shao (2008)	Y	Y	Y	Y	U	Y	U	NA	NA	Y	75	L
Fernandez (2016)	Y	Y	Y	Y	N	Y	U	NA	NA	Y	75	L
Al-Shareef (2016)	Y	Y	N	Y	U	Y	U	NA	NA	Y	62,50	M
Yan (2014)	Y	Y	Y	Y	U	Y	Y	NA	NA	N	75	L
Seppälä (2016)	Y	Y	Y	Y	U	Y	Y	NA	NA	Y	87,50	L
Vora (2003)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NA	NA	Y	87,50	L
Kantola (2000)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NA	NA	Y	87,50	L
Chuang (2006)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NA	NA	Y	87,50	L
Ding (2014)	Y	N	N	N	Y	Y	Y	NA	NA	Y	62,50	M
Forootan (1999)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	NA	Y	87,50	L

Q1. Oliko tutkimuksessa selkeät kriteerit potilaiden mukaan ottamiseen liittyen?

Q2. Oliko määrittelevä muuttuja mitattu standardinmukaisella ja luotettavalla tavalla kaikkien potilaiden kohdalla?

Q3. Oliko tutkimukseen osallistuneiden kaikkien potilaiden tilan tunnistamiseen sovellettu päteviä menetelmiä?

Q4. Olivatko tutkimukseen osallistuneet potilaat otettu mukaan ajallisesti tietyn ajan sisällä peräkkäin?

Q5. Olivatko tutkimukseen otettu mukaan kaikki potilaat?

Q6. Oliko tutkimukseen osallistuneista potilaista selkeästi ilmoitettu väestöryhmä?

Q7. Oliko tutkimukseen osallistuneista potilaista selkeästi ilmoitettu kliiniset tiedot?

Q8. Olivatko tutkimuksen lopputulemat tai tapausten päätepisteiden tulokset selkeästi ilmoitettu?

Q9. Oliko tutkimuksessa selkeästi ilmoitettu väestötieteellinen alue tai klinikka, jonka potilaiden tuloksiin tutkimus perustuu?

Q10. Olivatko tutkimuksen tilastolliset analyysit asianmukaiset?

\*Y=Kyllä/"Yes", N=Ei/"No", U=Epäselvä/"Unclear", NA=Ei sovellettavissa/ "Not applicable" (Ei otettu huomioon prosentuaalisissa laskelmissa, joiden mukaan harhariski luokiteltiin)

Harhariski määriteltiin korkeaksi "H" ("high"), kun julkaisun tulokset saavuttivat 49 prosenttisesti tai vähemmän arvosanan "kyllä". Kohtalaiseksi "M" ("moderate") se määriteltiin, kun vastauksista "kyllä" oli 50%-69% ja matalaksi "L" ("low"), kun "kyllä"-vastauksia oli kaikista vastaksista 70% tai enemmän.